

Resonanzverhalten und Netzwerkoszillationen in der hippokampalen Formation der Ratte *in vitro*.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Diplom-Biologin Anne Boehlen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. rer. nat. habil. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Michael Brecht
 2. Prof. Dr. Uwe Heinemann
 3. Prof. Dr. Dietmar Schmitz

Tag der Einreichung: 23. September 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 5. März 2010

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABKÜRZUNGEN	iii
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	iv
III. TABELLENVERZEICHNIS UND TERMINOLOGIE	vi
IV. ZUSAMMENFASSUNG	vii
1. EINLEITUNG	1
1.1 Rhythmen des zentralen Nervensystems	1
1.2 Entstehung von Rhythmen	2
1.3 Die hippokampale Formation	3
1.3.1 Verschaltung der hippokampalen Formation	5
1.3.2 Histologischer Aufbau der hippokampalen Formation	6
1.4 Mechanismen von Resonanz und Oszillationen	8
1.5 Relevanz von Resonanz für Netzwerkoszillationen	10
1.6 Für Resonanz relevante Ionenleitfähigkeiten	11
1.6.1 Spannungsabhängige Ionenkanäle	12
1.6.2 Eigenschaften spannungsabhängiger Kaliumkanäle	12
1.6.3 Der KCNQ-Kanal	14
1.6.4 Der HCN-Kanal	15
1.6.5 Der persistierende Natriumstrom	16
1.7 Fragestellung dieser Arbeit	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Versuchstiere	20
2.2 Präparation von akuten Hirnschnitten	20
2.3 Lösungen und Pharmaka	21
2.4 Elektrophysiologische Ableitungen	22
2.4.1 Ganzzellaufleitung	22
2.4.1.1 Zellidentifikation und topographische Organisation	24
2.4.1.2 Datenanalyse intrazellulärer Ableitungen	25
2.4.1.3 Synaptische Übertragung	29
2.4.2 Feldpotentialableitung	30
2.4.2.1 Datenanalyse extrazellulärer Ableitungen	31
2.5 Statistiken	32
2.6 Histologie von Hirnschnitten	33
2.6.1 Biocytin Färbung	33
2.6.1.1 Diaminobenzidin	33
2.6.1.2 Streptavidin-Cy3	33
2.6.2 Andere Färbungen	34
2.6.2.1 Dextranamine	34
2.6.2.2 Kresylviolett-Färbung	35
3. ERGEBNISSE	36
3.1 Charakterisierung von Sternzellen der Schicht II des mEC	36
3.2 Eigenschaften in Abhängigkeit von Position und Alter	38
3.2.1 Die Latenz von APs	39
3.2.2 Die Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der dorso-ventralen Position und dem Alter	40
3.2.3 MPOs in Abhängigkeit von der dorso-ventralen Position und dem Alter	41

3.2.4 Die AP-Analyse in Hinblick auf das Resonanzverhalten	42
3.3 Pharmakologische Charakterisierung der Resonanz	44
3.3.1 Die Wirkung von KCNQ/Kv7/M-Kanal-Modulatoren auf passive und aktive Membraneigenschaften	45
3.3.1.1 Der Einfluss der M-Strom-Aktivatoren ICAGEN-110381 und Retigabin	45
3.3.1.2 Die Wirkung des M-Kanal-Blockers XE991	49
3.3.2 Der Einfluss von I_h auf passive und aktive Membraneigenschaften	51
3.3.3 Die Wirkung von Losigamon auf passive und aktive Membraneigenschaften	55
3.4 Resonanz und MPOs in Interneuronen der hippocampalen Formation	57
3.4.1 Interneurone mit MPOs aber ohne Resonanz	58
3.4.2 Resonante Interneurone im <i>Stratum radiatum</i> der CA1 Region	59
3.5 Elektrophysiologische Charakterisierung des M-Kanal-Modulators ICA im Hippokampus	61
3.5.1 Die Wirkung von ICA auf epileptiforme Aktivität	61
3.5.2 Die neuronale Erregbarkeit und das Resonanzverhalten unter ICA	63
3.5.3 Der Einfluss von ICA auf postsynaptische Ströme	65
3.6 Netzwerkoszillationen	67
3.6.1 Pharmakologische Charakterisierung Kainat-induzierter Netzwerkoszillationen	68
3.6.2 Die Wirkung von Retigabin auf Netzwerkoszillationen im Hippokampus	70
3.6.3 Die Wirkung von ZD7288 auf Netzwerkoszillationen im Hippokampus	72
3.6.4 Die Wirkung von Losigamon auf Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen	75
4. DISKUSSION	77
4.1 Sternzeleigenschaften in Abhängigkeit von der Position	77
4.2 Entwicklungsabhängigkeit von Sternzeleigenschaften	78
4.3 Pharmakologische Charakterisierung der Resonanz von Sternzellen	81
4.3.1 Modulation der Sternzeleigenschaften durch den I_M	82
4.3.2 Modulation der Sternzeleigenschaften durch den I_h	84
4.3.3 Modulation der Sternzeleigenschaften durch Losigamon	86
4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung des M-Kanal-Modulators ICA im Hippokampus	86
4.5 Netzwerkoszillationen	89
4.5.1 Netzwerkoszillationen im θ -Bereich	90
4.5.2 Netzwerkoszillationen im γ -Bereich	92
A. LITERATURVERZEICHNIS	96
B. DANKSAGUNG	121
C. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	122

I. ABKÜRZUNGEN

ACSF	artifizielle Zerebrospinalflüssigkeit
f/m/sAHP	schnelle, mittlere, langsame Nachhyperpolarisation
AMPA	(S)- α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolepropionsäure
AP	Aktionspotential
CA1-4	<i>Cornu Ammonis</i> 1-4
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DAP	Depolarisation nach einem Aktionspotential
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
(m)EC	(medialer) Entorhinalkortex
EEG	Elektroenzephalogramm
EPSC/P	exzitatorischer/s postsynaptischer/s Strom/Potential
mEPSC	Miniatur-EPSC
sEPSC	spontaner EPSC
GABA	γ -Aminobuttersäure
IPSC/P	inhibitorischer/s postsynaptischer/s Strom/Potential
mIPSC	Miniatur-IPSC
sIPSC	spontaner IPSC
I_h	H-Strom
I_{NaP}	persistierender Natriumstrom
I_M	KCNQ/Kv7/M-Strom
ICA	ICAGEN-110381
Kv-Kanal	spannungsabhängiger Kaliumkanal
MPO	Membranpotentialoszillation
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
R_{input}	Membranwiderstand
RMP	Ruhemembranpotential
RTG	Retigabin
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TTX	Tetrodotoxin
Z, Z_0 , Z_{20}	Impedanz, bei 0 Hz und bei 20 Hz
ZNS	zentrales Nervensystem

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	Schematische Darstellung des Rattenhirns und des entsprechenden Hirnschnittpräparates.	4
2	Schematische Darstellung der Informationsweiterleitung durch den hippokampalen trisynaptischen Schaltkreis.	6
3	Schematische Darstellung des EC im Hirnschnittpräparat eines Nagetieres.	7
4	Schematische Darstellung der Mechanismen von Resonanz.	10
5	Typische Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals.	13
6	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für intrazelluläre Ableitungen.	23
7	Fotografien horizontaler und koronarer Hirnschnitte (Kresylviolett-Färbung).	25
8	Analyse der intrinsischen Zelleigenschaften einer Sternzelle der Schicht II des mEC.	26
9	Analyse der Resonanzeigenschaften einer Sternzelle des mEC.	28
10	MPO-Analyse einer Sternzelle des mEC.	29
11	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für extrazelluläre Ableitungen.	31
12	Analyse der hippocampalen Netzwerkoszillationen.	32
13	Morphologie von Sternzellen des mEC.	36
14	Analyse intrinsischer Eigenschaften von Sternzellen in Schicht II des mEC.	38
15	AP-Latenz von adulten Sternzellen in Schicht II des mEC.	39
16	Resonanzfrequenzanalyse von Sternzellen in Schicht II des mEC.	41
17	Frequenzanalyse von MPOs von Sternzellen in Schicht II des mEC.	42
18	Analyse der Sternzeleigenschaften unter ICA oder RTG.	46
19	AP-Analyse unter ICA oder RTG.	47
20	Wirkung von ICA und RTG auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC.	48
21	Analyse der Zelleigenschaften unter XE991.	49
22	AP-Analyse unter XE991.	50
23	Wirkung von XE991 auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC.	51
24	Analyse der Zelleigenschaften unter ZD7288.	52
25	AP-Analyse unter ZD7288.	53
26	Wirkung von ZD7288 auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC.	54
27	Analyse der Sternzeleigenschaften unter Losigamon.	55
28	AP-Analyse von Sternzellen unter Losigamon.	56

29	Wirkung von Losigamon auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC.	57
30	Neuron in der Schicht II des mEC.	58
31	Dextranamin-positives Neuron Typ I nach DG-Injektion im <i>Stratum radiatum</i> .	59
32	Dextranamin-positives Neuron Typ II nach DG-Injektion im <i>Stratum radiatum</i> .	60
33	ICA blockiert epileptiforme Aktivität im Hippokampus und mEC.	62
34	Wirkung von ICA auf intrinsische Zelleigenschaften von Pyramidenzellen in der CA1 Region.	64
35	Eigenschaften von sEPSCs und mEPSCs von Pyramidenzellen in der CA1 Region.	66
36	Eigenschaften von sIPSCs und mIPSCs von Pyramidenzellen in der CA1 Region.	67
37	Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen in der CA3b Region im γ -Frequenzbereich.	68
38	Kainat-induzierte γ -Oszillationen werden in horizontalen Hirnschnitten durch RTG blockiert.	71
39	Kainat-induzierte θ -Oszillationen werden in koronaren Hirnschnitten durch RTG blockiert.	72
40	Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen werden durch ZD7288 blockiert.	74
41	Kainat-induzierte γ -Oszillationen werden in horizontalen Hirnschnitten durch Losigamon reversibel blockiert.	76

III. TABELLENVERZEICHNIS UND TERMINOLOGIE

1	Zusammenfassung der wesentlichen Eigenschaften von adulten Sternzellen des mEC.	37
2	Zusammenfassung der wesentlichen Parameter des Entladungsverhaltens von Sternzellen des mEC in Abhängigkeit von Position und Alter.	43
3	Zusammenfassung des Resonanzverhaltens und der MPOs von Sternzellen des mEC in Abhängigkeit von Position und Alter.	44
4	Zusammenfassung der Zelleigenschaften von Dextranamin-positiven Zellen nach Injektion in den DG.	61
5	Zusammenfassung der Zelleigenschaften von Pyramidenzellen der CA1 Region nach Badapplikation von ICA.	65

TERMINI TECHNICI,

die auch im deutschsprachigen Raum häufig nicht übersetzt werden, wurden zum Teil nicht eingedeutscht jedoch eingeführt. Das gilt zum Beispiel für *Patch-Clamp* und *Power*.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Rhythmische Aktivität ist eine wesentliche Eigenschaft neuronaler Informationsverarbeitung. Neuronale Oszillationen werden abhängig vom Hirnareal und den funktionellen Anforderungen an den Organismus beobachtet und nach Frequenzbändern unterteilt. Für ihre Entstehung sind die zugrundeliegende neuronale Verschaltung, die Interaktion von Erregung und Hemmung und die Eigenschaften individueller Neurone von Bedeutung. Abweichungen von den funktionellen Rhythmen führen zu Erkrankung wie zum Beispiel Epilepsie.

Ziel dieser Arbeit war es unter Verwendung elektrophysiologischer Messmethoden oszillatorische Aktivität in der hippocampalen Formation der Ratte zu studieren. Das Hauptaugenmerk galt hierbei den Mechanismen, die auf Einzelzell- und Netzwerkebene Resonanzverhalten und Oszillationen in akuten Hirnschnitten unterstützen.

Sternzellen der Schicht II des medialen Entorhinalkortex spielen eine tragende Rolle in der Genese von θ -Rhythmen in dieser Region und zeigen eine ausgeprägte Resonanz gegenüber Stimuli im θ -Bereich. Es stellte sich heraus, dass die Resonanzfrequenz von Sternzellen einem altersabhängigen, dorso-ventralen Gradienten folgt. Aktive und passive Zelleigenschaften wie Membranwiderstand, Rheobase und Membranzeitkonstante zeigten ebenfalls diesen Gradienten. Pharmakologische Untersuchungen ergaben jedoch, dass das Resonanzverhalten von Sternzellen im Wesentlichen vom H-Strom getragen wird. Diese Leitfähigkeit sollte demnach auch in anderen Zellen zu Resonanz führen, was in weiteren Zelltypen der hippocampalen Formation untersucht wurde. Diese Vermutung wurde unter anderem von Interneuronen im *Stratum radiatum* der CA1 Region bestätigt, die transfissural mit dem *Gyrus dentatus* in Verbindung standen und deutliche Resonanz im θ -Bereich zeigten. Pyramidenzellen in der CA1 Region verfügen ebenso über den M- und H-Strom. Interessanterweise zeigte sich bei diesem Zelltyp, dass eine Verstärkung des M-Stroms nicht notwendigerweise Einfluss auf das Resonanzverhalten hat, obwohl andere Parameter wie das Ruhemembranpotential oder das Entladungsverhalten sich als sehr einflussreich erwiesen. Es ist also davon auszugehen, dass zumindest der H-Strom eine universelle Voraussetzung für Einzelzellresonanz darstellt.

Unter der Annahme, dass Einzelzellresonanz zu Netzwerkoszillationen beiträgt, sollte die Blockade von Leitfähigkeiten, die Resonanz begünstigen, Einfluss auf komplexere Oszillationen haben. In der Tat, beeinflusste die pharmakologische Modulation von M- und H-Strom dosisabhängig sowohl γ - als auch θ -Oszillationen im Hippokampus. Das bedeutet zum einen, dass spezifische Ionenleitfähigkeiten oszillatorisches Verhalten von der Einzelzelle bis zum Netzwerk unterstützen können. Zum anderen ist es ein relevantes Ergebnis in Hinblick

auf die therapeutische Verwendung der hier benutzten Antikonvulsiva, welche somit möglicherweise negative Konsequenzen für höhere Gehirnfunktionen wie Erinnerung und Lernen haben. Die vorliegende Studie verdeutlicht, dass Resonanz individueller Neurone ein verbreitetes Phänomen ist, das auf die Anwesenheit bestimmter Ionenleitfähigkeiten zurückgeführt werden kann, und möglicherweise entscheidend zu Netzwerkoszillationen im θ -Frequenzbereich beiträgt.

1. EINLEITUNG

Rhythmen sind in biologischen Systemen auf ganz unterschiedlichen Ebenen anzutreffen. Die offensichtlichsten Beispiele hierfür sind der Herzschlag und die Atmung. Darüber hinaus unterliegt eine Vielzahl physiologischer Funktionen, wie zum Beispiel die Freisetzung verschiedener Hormone, einer circadianen Rhythmik. Die Frequenz dieser Rhythmen unterliegt einer komplexen Modulation in Reaktion auf die physiologischen Anforderungen. Die Entstehung der Rhythmen unterscheidet sich von der Modulation. So ist zum Beispiel die Generation des Herzschlags eine intrinsische Eigenschaft des Sinusknotens im rechten Vorhof. Der Herzschlag hat eine typische Eigenfrequenz, die von spezifischen zellulären Eigenschaften abhängt, jedoch von einer Reihe konvergierender Signale (zum Beispiel vom vegetativen Nervensystem und Hormonen) gesteuert werden kann. Andere Rhythmen, wie die Atmung, werden direkt im zentralen Nervensystem (ZNS) generiert. Hierbei ist charakteristisch, dass die Frequenz den jeweiligen Funktionszustand (zum Beispiel körperliche Belastung) widerspiegelt oder auch erst ermöglicht. Ein solcher Zusammenhang lässt sich auch für das ZNS herstellen.

1.1 RHYTHMEN DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS

Die Dynamik der elektrischen Aktivität innerhalb des normalen und pathophysiologisch veränderten Gehirns wurde zum ersten Mal am Menschen von Hans Berger im Jahr 1929 anhand eines Elektroenzephalogramms (EEG) beschrieben (Berger, 1929). Er bemerkte zunächst, dass die über dem visuellen Kortex abgeleitete elektrische, oszillatorische Aktivität davon abhängt, ob der Proband zum Beispiel die Augen geöffnet oder geschlossen hat, sich im entspannten Ruhezustand befindet oder sich einer geistigen Aufgabe widmet. Er erkannte weiterhin, dass ein Wechsel von einem funktionellen Zustand in einen anderen von einer Verschiebung der Frequenz der beobachteten Oszillationen im EEG begleitet ist (der nach ihm benannte Berger-Effekt). In Folge dieser Beobachtung wurden weitere Rhythmen entdeckt. Es stellte sich heraus, dass die EEG-Aktivität in verschiedenen Frequenzbändern mit funktionellen Zuständen des ZNS assoziiert ist. Langsame Rhythmen, wie im δ -Bereich (bis 3 Hz), sind zum Beispiel für den Tiefschlaf charakteristisch, während der von Berger benannte α -Rhythmus (8-12 Hz) im entspannten Wachzustand anzutreffen ist. θ -Rhythmen (4-8 Hz) stellen den prominentesten Rhythmus im EEG von Säugetieren und Menschen dar (O'Keefe & Burgess, 1999). Diese Rhythmen lassen sich in *in vitro* Präparationen und in anästhesierten Tieren auslösen und beobachten und können daher gut Verhalten und zellulären Eigenschaften zugeordnet werden. Höhere Frequenzen, wie der β -Rhythmus (12-30 Hz), sind im EEG des wachen, konzentrierten Menschen vorzufinden. Zusätzlich zum dominanten Frequenzband können Rhythmen im EEG

auch nach ihrer Amplitude und den beteiligten Gehirnbereichen klassifiziert und Aufgaben zugeordnet werden (Leung et al., 1982; Buzsáki et al., 1983). Auch hochfrequente Rhythmen sind im ZNS anzutreffen. γ -Oszillationen (30-100 Hz) wurden insbesondere mit dem *Binding*-Problem in Verbindung gebracht (zur Übersicht Engel et al., 1999; Revonsuo & Newman, 1999), welches sich mit der Frage beschäftigt, wie die Aktivität einzelner Zellen zu einer Gesamtwahrnehmung zusammengefasst wird. Eine dominante Theorie ist, dass neuronale Populationen, die ein gemeinsames Konzept kodieren, in einer bestimmten Phasenrelation im γ -Bereich oszillieren. Eine interessante Beobachtung ist, dass γ -Oszillationen oftmals in θ -Oszillationen eingebettet sind und die Kohärenz von γ -Oszillationen abfallen kann, wenn θ -Oszillationen abgeschwächt werden (Vanderwolf, 1969) ohne in Abwesenheit von θ -Rhythmen völlig zu verschwinden (Wulff et al., 2009). Das bedeutet, dass verschiedene Oszillationen nicht isolierte Phänomene sind, sondern sich gegenseitig beeinflussen und demzufolge gemeinsame physiologische Korrelate besitzen könnten. Spezifische rhythmische Hirnaktivität ist ebenfalls in verschiedenen pathophysiologischen Phänomenen anzutreffen. Eines der geläufigsten Beispiele ist die Epilepsie. Dabei kommt es durch das Abweichen von funktionellen Rhythmen zur Ausbildung des Krankheitsbildes. Hier kann die Analyse der EEG-Muster Aufschluss über Art- und Ort der Entstehung liefern.

1.2 ENTSTEHUNG VON RHYTHMEN

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen zwei Aspekten der Entstehung von rhythmischer Aktivität im ZNS. Zum einen kann es sich um eine Eigenschaft eines neuronalen Netzwerks handeln, die sich aus der anatomischen Organisation des Netzwerks ergibt. Relativ einfach gebaute Netzwerke aus sich gegenseitig erregenden und hemmenden Neuronen zeigen bereits theoretisch die Fähigkeit zum Oszillieren (Wulff et al., 2009). Das Verbindungsmuster zwischen Neuronen kann insbesondere durch hemmende Rückkopplungsschleifen zur Entstehung von Rhythmen führen. Dabei bestimmen die Latenzen der synaptischen Übertragung, der postsynaptischen Integration und der axonalen Signalfortleitung den Frequenzbereich. Auch ist es theoretisch ausreichend, wenn die Rückkopplung ausschließlich auf hemmendem Weg erfolgt (Bartos et al., 2007). Dabei ist es prinzipiell nicht notwendig, dass die beteiligten Neurone selbst oszillatorische Eigenschaften besitzen. Die Kopplung muss weiterhin nicht auf lokaler Ebene erfolgen, sondern kann durchaus mehrere Hirnareale involvieren. So wird zum Beispiel bei der Genese von kortikalen α - und β -Rhythmen die Beteiligung des Thalamus, des Kortex und der Hemmung aus dem *Nucleus reticularis thalami* angenommen (Steriade et al., 1987). Zum anderen können durch intrinsische Eigenschaften einzelner Zellen Oszillationen entstehen. Hier

treiben einzelne, zu eigenständigen Oszillationen fähige Neurone, sogenannte Schrittmacher-Zellen, das Netzwerk an. Als Grundlage für den intrinsischen Rhythmus ist die Fähigkeit eines Neurons entscheidend, selbstständig, also ohne synaptische Vermittlung, das Membranpotential in regenerativer Weise über die Entladungsschwelle zu verschieben und so eine anhaltende, rhythmische Aktivität zu generieren (Lüthi & McCormick, 1998).

Darüber hinaus existieren weitere intrinsische Mechanismen, die Neurone in eine Netzwerkoszillation einbinden können. Ein Beispiel hierfür ist die neuronale Resonanz (Hut et al., 2002). Resonante Neurone reagieren besonders sensibel auf die rhythmische Aktivierung ihrer synaptischen Eingänge bei Frequenzen, die nahe der sogenannten Eigenfrequenz des Neurons liegen (Hutcheon & Yarom, 2000). Dadurch wird es dem Neuron möglich, präferenziell in Netzwerkoszillationen eingebunden zu werden, deren Hauptfrequenz nahe ihrer Resonanzfrequenz liegt. Diese Eigenschaft wird durch Membranströme getragen, die unterhalb des Schwellenpotentials für Aktionspotentiale (AP) aktiv sind (Hutcheon & Yarom, 2000; Schreiber et al., 2004). Sie leisten so vermutlich einen wesentlichen Beitrag in der Rhythmogenese und der Synchronisation elektrischer Aktivität im ZNS.

Vermutlich wird keiner der vorgestellten Mechanismen unter physiologischen Bedingungen allein für die Entstehung von Oszillationen verantwortlich sein. Das zeigt sich unter anderem dadurch, dass die gezielte Unterbrechung der hemmenden Rückkopplung einzelne Oszillationen differenziell beeinflusst (Wulff et al., 2009). Es ist insbesondere unklar, inwieweit neuronale Resonanz an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Netzwerkoszillationen beteiligt ist. Weiterhin ist die Frage offen, ob und wie Resonanz über die Einbindung einzelner Neurone in das oszillierende Zellensemble im Detail bestimmt. Der Schwerpunkt dieser Arbeit wurde daher auf die Mechanismen der Resonanz im Zusammenhang mit Netzwerkoszillationen gelegt.

1.3 DIE HIPPOKAMPALE FORMATION

Es existiert eine Reihe von Modellsystemen für das Studium von Oszillationen. Die hippocampale Formation ist neben anderen kortikalen Strukturen besonders geeignet, da sich hier eine starke Korrelation von oszillatorischen Aktivitätsmustern und Verhalten bei reduzierter Komplexität der Verschaltung gegenüber dem Neocortex beobachten lässt (Buzsáki, 2005). Viele Neuronen im Hippokampus sind in bestimmten Phasen von γ - und θ -Oszillationen besonders aktiv (zur Übersicht Somogyi & Klausberger, 2005). Hierbei ist insbesondere von Interesse, dass die Phasenbeziehung zwischen θ -Oszillationen und den Entladungssalven einzelner Einheiten räumliche Positionen kodieren können (O'Keefe & Recce, 1993). Oszillationen dienen demzufolge als Referenzsystem um räumliche Informationen durch eine zeitliche Kodierung zu repräsentieren (*Hippocampal Phase Precession*). θ -Oszillationen

1. Einleitung

überlagern und modulieren darüber hinaus γ -Oszillationen (zur Übersicht Lisman, 2005), welche ihrerseits auch als zeitliche Referenz dienen und dadurch Neurone funktionell gruppieren können. Phasenbeziehungen sind jedoch nicht nur für Kodierung entscheidend, sondern bestimmen zudem Plastizitätsregeln von Synapsen (Markram et al., 1997).

Im Folgenden soll kurz auf die Anatomie des Hippokampus eingegangen werden (zur Übersicht Amaral & Witter, 1989; Witter & Amaral, 2004) Unter dem Begriff der **hippokampalen Formation** des Säugerhirns werden die Strukturen Hippokampus, *Gyrus dentatus* (DG), Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum und Entorhinalkortex (EC) zusammengefasst, welche dem limbischen System angehören. Der dreischichtige Archikortex besteht aus Hippokampus, DG und dem Subikulum, welches das Verbindungsglied zum sechsschichtigen Neokortex darstellt (Abb. 1).

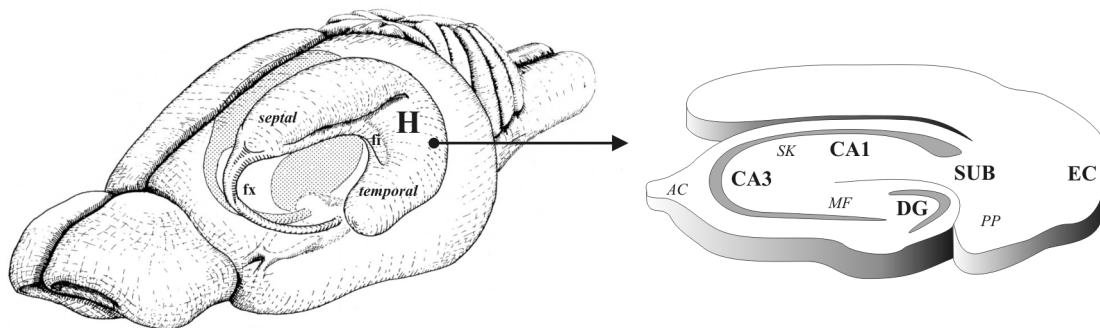


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Rattenhirns und des entsprechenden Hirnschnittpräparates. Im linken Bereich ist das gesamte Hirn abgebildet. Folgende Strukturen sind gekennzeichnet: Hippokampus (H), Fimbria (fi), Fornix (fx). Rechts ist als Vergrößerung das kombinierte Hirnschnittpräparat des rechten Hippokampus und des Entorhinalkortex, wie es in dieser Arbeit verwendet wurde, zu sehen. Die folgenden Strukturen sind beschriftet: CA3 und CA1 des Ammonshorns (*Cornu ammonis*, CA), *Gyrus dentatus* (DG), Entorhinalkortex (EC), Subikulum (SUB) und in kursiver Schrift die Faserverbindungen: Schaffer-Kollaterale (SK), Moosfaser (MF), assoziierte Kommissurfaser (AC), *Tractus perforans* (PP) (modifiziert nach Amaral & Witter, 1995).

Als Teil der hippokampalen Formation besteht der eigentliche **Hippokampus** aus den Regionen 1-4 des *Cornu ammonis* (Ammonshorn; CA1-4, Lorente de Nó, 1934). Er ist in den Temporallappen eingebettet und gehört zu den wichtigsten Verbindungen im *Papez*-Kreis, welcher über den Hippokampus hinaus Amygdala, Fornix und den *Nucleus anterior thalami* beinhaltet. Histologisch handelt es sich beim Hippokampus um eine laminare Struktur, die jedoch im Vergleich zum Neokortex vergleichsweise einfach aufgebaut ist und nur eine Zellschicht aufweist – die Pyramidenzellschicht. Die angrenzenden Schichten sind relativ arm an Neuronen und beinhalten eine recht heterogene Population von Interneuronen (Somogyi & Klausberger, 2005).

1.3.1 Verschaltung der hippocampalen Formation

Jede einzelne Region der hippocampalen Formation ist durch ihre spezifischen synaptischen Ein- und Ausgänge als auch durch die intrinsischen Eigenschaften ihrer Neurone charakterisiert. Die grobe synaptische Verschaltung der einzelnen Regionen ist gut beschrieben (Abb. 2). Die Körnerzellen der *Area dentata* projizieren über die Moosfasern auf die CA3 Pyramidenzellen. Axonverzweigungen dieser Zellen gehen über die Schaffer-Kollateralen synaptische Verbindungen mit den Pyramidenzellen der CA1 Region ein, welche ihrerseits ihre Axone in das Subikulum senden. Das Subikulum projiziert in verschiedene kortikale und subkortikale Hirnareale (Andersen et al., 1971). Neben dieser trisynaptischen hippocampalen Schleife existieren weitere Verbindungen: von den Pyramidenzellen der CA3 Region zum kontralateralen Hippokampus (Ishizuka et al., 1990), innerhalb der *Area dentata* (Ribak et al., 1985) und in einem regionalen Netz von inhibitorischen Interneuronen (Seress & Ribak, 1983).

Den wesentlichen kortikalen Eingang erhält der Hippokampus über neuronale Zellen der Schicht II des medialen EC (mEC), welcher eine Schlüsselposition zwischen kortikalen Strukturen und der hippocampalen Formation einnimmt. Diese Zellen projizieren über den *Tractus perforans* zu den Körnerzellen und den inhibitorischen Interneuronen der *Area dentata*. Der entorhinale Eingang wird in zwei Anteile unterteilt: ein Faserbündel nimmt im medialen Anteil des EC seinen Ausgang und projiziert in das mittlere Drittel des *Stratum moleculare* (Dendritenschicht der Körnerzellen). Ein weiteres Faserbündel entspringt im lateralen Anteil des EC und projiziert in das äußere Drittel des *Stratum moleculare*. Neben dieser Projektion vom EC zum Hippokampus existiert ein weiterer entorhinaler Eingang, welcher monosynaptische Kontakt mit Pyramidenzellen der CA1 Region und des Subikulums sowie regionalen Subpopulationen von inhibitorischen Interneurone eingeht (Lacaille & Schwartzkroin, 1988; Witter, 1993). Dieses Faserbündel wird auch als temporo-ammonische Projektion bezeichnet. Es entspringt in der Schicht III des EC und stellt somit einen der trisynaptischen Schleife entgegen gesetzten Eingang dar (Wyss, 1981; Tamamaki & Nojyo, 1995; Empson & Heinemann, 1995). Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieser Projektion ist bislang unklar.

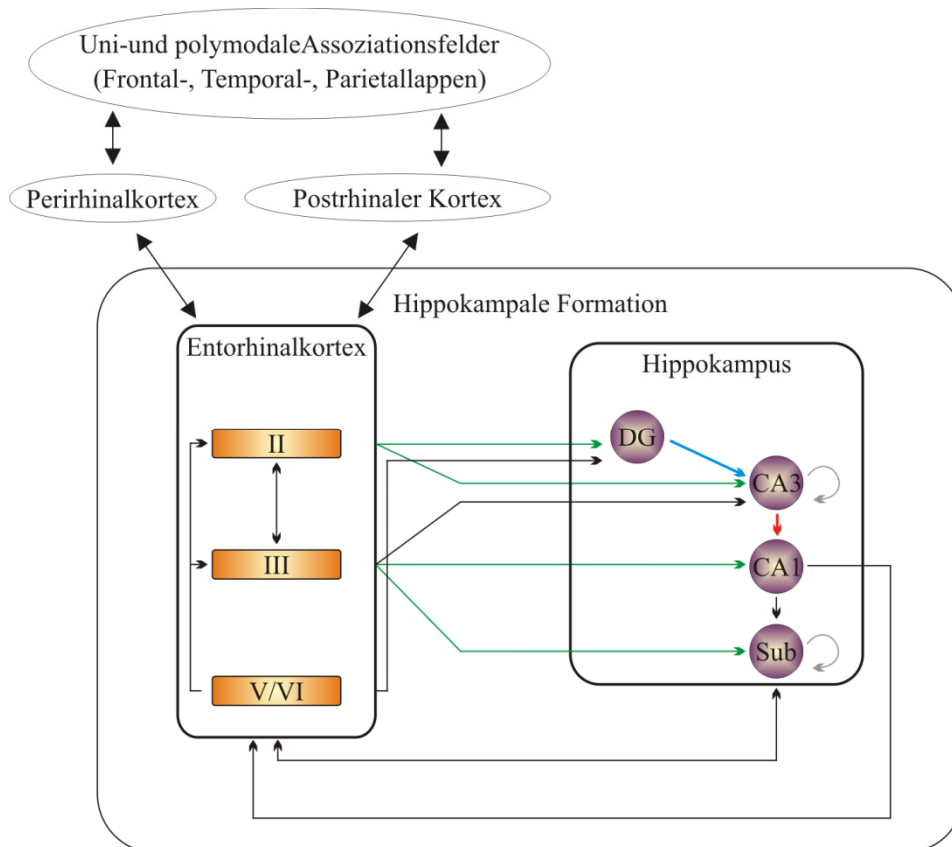


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Informationsweiterleitung durch den hippocampalen trisynaptischen Schaltkreis. Die Hippokampale Formation kann als uni-direktionales Netzwerk verstanden werden. Der Hippokampus bekommt seine Eingänge aus dem EC, der über den lateralen und medialen *Tractus perforans* (*Perforant Path*) mit den Körnerzellen des DG und den Pyramidenzellen der CA3 Region in Verbindung steht. Über Moosfasern projizieren die Axone der Körnerzellen auf CA3 Pyramidenzellen. Von dort aus werden Signale über die Schaffer-Kollateralen zu den proximalen Dendriten der CA1 Pyramidenzellen fortgeleitet. Sowohl zwischen den Zellen der CA3 Region untereinander, als auch zwischen CA3 und CA1 Pyramidenzellen sind rekurrente Kollaterale ausgebildet. Zusätzlich erhalten CA1 Neurone einen direkten Eingang vom EC zu ihren distalen Apikaldendriten über den *Tractus perforans*. Von den Pyramidenzellen der CA1 Region verlaufen die Axone direkt, und nach Umschaltung im Subikulum zurück zum EC (Darstellung in Anlehnung an Huang et al., 1995).

1.3.2 Histologischer Aufbau der hippocampalen Formation

Der EC ist im Gegensatz zu dem dreischichtigen Hippokampus komplexer aufgebaut. Unter anatomischen und funktionellen Gesichtspunkten wird der EC in eine mediale und laterale Region unterteilt. Auch er ist eine laminare Struktur, die jedoch stärker gegliedert ist als der Hippokampus und zwei Pyramidenzellschichten enthält (Abb. 3). Der EC besteht aus sechs Schichten, die aufgrund ihrer inneren Struktur und extrinsischer Verschaltungen in eine obere (äußere) und eine tiefere (innere) Hauptschicht unterteilt werden (Witter et al., 1989). Dabei gehören die Schichten I-III zur oberen und die Schichten V-VI zur tiefen Hauptschicht des EC. Die Schicht IV ist nahezu frei von Zellkörpern und wird auch *Lamina dissecans* genannt. Sie trennt die oberen und tieferen Schichten voneinander.

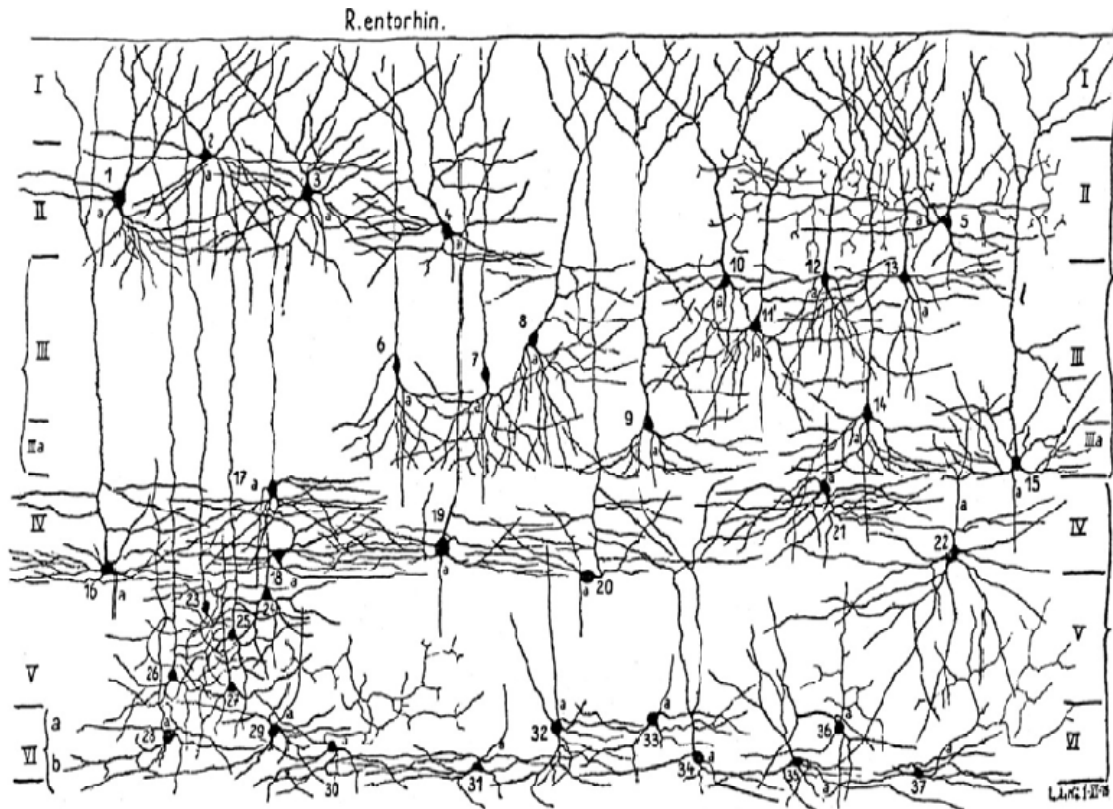


Abbildung 3: Schematische Darstellung des EC im Hirnschnittpräparat eines Nagetieres (nach Lorente de Nó, 1934). Grob gliedern kann man den EC in Schichten, die hauptsächlich Pyramidenzellen enthalten (Schicht III und V-VI). Pyramidenzellen (6, 9, 26, 27) sind unter anderem charakterisiert durch ihren in Richtung der Kortexoberfläche orientierten Stammdendriten. Die Schicht II beherbergt unter anderem die Sternzellen (2, 3). Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl weiterer Neuronentypen und natürlich auch nichtneuronale Zellen (zum Beispiel Astrozyten, Oligodendrozyten etc.).

Alle Signale, die den Kortex verlassen, werden durch Pyramidenzellen vermittelt. Pyramidenzellen sind nach ihrem, unter dem Mikroskop dreieckig anmutenden Soma benannt. Diese Zellen, inklusive ihrer Dendriten und Axone, sind weitgehend orthogonal zur Kortexoberfläche ausgerichtet. Pyramidenzellen können zwar in allen kortikalen Schichten vorkommen, ihre Somata sind jedoch besonders häufig in Schicht III und V-VI anzutreffen. Die Morphologie und Konnektivität der Pyramidenzellen in den einzelnen Schichten ist unterschiedlich. Die Axone dieser exzitatorischen, zumeist glutamatergen Pyramidenzellen stellen den Großteil der weitreichenden Projektionen im ZNS dar. Im Gegensatz dazu, sind Interneurone typischerweise auf die graue Substanz beschränkt, ihre Dendriten und Axone verlassen den Kortex nicht. Es gibt mehrere Typen von Interneuronen. Viele davon sind inhibitorische Zellen, die γ -Amino-Buttersäure (GABA) als Transmitter verwenden. Sie werden deshalb auch GABAerge Interneurone genannt (zum Beispiel Korbzellen oder *Chandellier*-Zellen). Sie können anhand der Position ihrer Zellkörper, ihrer axonalen und dendritischen

Morphologie und ihrer funktionellen Rolle im Netzwerk differenziert werden. Des Weiteren gibt es auch exzitatorische Interneurone, sogenannte Sternzellen. Ihre Somata liegen in primär sensorischen Arealen vorrangig in Schicht IV. Sie bilden Verbindungen zwischen Schicht IV und den Schichten III, V und VI. Funktionell bedeutsam ist dieser Zelltyp, weil er die Verbindung zwischen thalamo-kortikalen Eingängen und anderen Zellen des Kortex herstellt.

Im mEC befinden sich Sternzellen in hoher Dichte in der Schicht II. Morphologisch sind sie charakterisiert durch mehrere (4-8), relativ dicke Primärdendriten, die sich schnell und häufig weiter verzweigen. Diese Dendriten sind dicht mit Dornfortsätzen (*Spines*) besetzt. Ihr dendritisches Feld deckt im Vergleich zu Pyramidenzellen ein großes Areal ab und erstreckt sich bis an die Kortexoberfläche. Die großkalibrigen Axone von Sternzellen zweigen meist aus einem Stammendriten ab und bilden viele Kollateralen (Klink & Alonso, 1997a). Im Gegensatz zu anderen Sternzellen des Neokortex projizieren ihre Axone lokal und auch in andere Regionen der hippocampalen Formation. Es wird angenommen, dass sie den Hauptanteil von Axonen stellen, die als *Tractus perforans* die Schicht II des mEC mit dem DG und der CA3 Region des Hippokampus verbinden (Witter et al., 1989).

Funktionell sind Sternzellen insofern interessant, als dass sie über eine charakteristische Resonanz und über Membranpotentialoszillationen (MPOs) im θ -Bereich verfügen (Klink & Alonso, 1997b; Erchova et al., 2004; Nolan et al., 2007). Von ihnen wird angenommen, dass es sich um die funktionell bedeutsamen Rasterzellen (*Grid Cells*) handelt (Garden et al., 2008; Giocomo & Hasselmo, 2008). Die Resonanz und die MPOs dieser Zellen könnten funktionell entscheidend sein, da sie mit der Feldgröße des Rasters korrelieren (Giocomo et al., 2007). Resonanz ist potenziell nicht nur im mEC von Bedeutung. Auch die Oszillationsfrequenz von Pyramidenzellen im Hippokampus scheint mit der räumlichen Auflösung von Platzzellen (*Place Cells*) entlang der septo-temporalen Achse zu korrelieren (Maurer et al., 2005).

1.4 MECHANISMEN VON RESONANZ UND OSZILLATIONEN

Oszillationen unterhalb des Schwellenpotentials von APs können in zwei Untergruppen unterteilt werden. Zum einen können intrinsische Membraneigenschaften zu einer frequenzabhängigen Verstärkung von synaptisch oder elektrotonisch verursachten Membranpotentialveränderungen führen, die wegen ihrer Bandpasseigenschaften auch Impedanz- oder Membranresonanz genannt wird – kurz Resonanz.

Resonanz ist ein Phänomen, das nicht nur in biologischen Systemen beschrieben worden ist. Schon im Alten Testament gibt es Hinweise auf Resonanz beziehungsweise Resonanzkatastrophen. So wurde berichtet, dass durch Trompetenstöße und Geschrei die Stadtmauern von Jericho eingestürzt seien und so die Stadt erobert werden konnte, oder dass, als

im Jahr 1850 Soldaten im Gleichschritt über die Hängebrücke von Angers marschierten, die dadurch in Schwingungen ähnlich ihrer Eigenfrequenz geriet und einstürzte.

In der Neurophysiologie spielt Resonanz eine bedeutende Rolle für Neurone, da diese so nicht nur auf die Häufigkeit einer eingehenden Erregung, sondern auch auf deren Rhythmus reagieren können. Dieses Resonanzphänomen kann daher als ein Schlüsselereignis angesehen werden, um den frequenzabhängigen und damit implizit zeitabhängigen Informationsfluss zu ermöglichen (Gloveli et al., 1997a; Chrobak & Buzsáki, 1998; Dickson et al., 2000). Resonante Neurone sind in der Lage, Eingänge bei Frequenzen außerhalb der Eigenfrequenz zu ignorieren beziehungsweise eingehende Information entsprechend ihrer Frequenz zu gewichten. Innerhalb ihrer Eigenfrequenz generieren sie Spannungsänderungen auf sonst unterschwellige Erregung, die so groß sein können, dass es zur Auslösung eines oder mehrerer APs kommt. In der Elektrophysiologie wird dieses Resonanzphänomen vor allem durch eine Spektralanalyse der Membranimpedanz von Neuronen bei sinusförmigen Strominjektionen verdeutlicht.

Den Mechanismus der Resonanz von Neuronen kann man sich durch den Vergleich mit elektrischen Schaltkreisen mit ähnlichen Frequenzpräferenzen veranschaulichen (Abb. 4). Würde ein Neuron ausschließlich einem ohmschen Widerstand gleichen, so würde sich keine Frequenzabhängigkeit einstellen (Abb. 4A). Die neuronale Membran besitzt jedoch nicht nur einen Widerstand sondern auch eine Kapazität, die, um das Membranpotential zu verändern, umgeladen werden muss (Abb. 4B). Ein solches paralleles RC-Glied hat typischerweise Tiefpasseigenschaften. Das bedeutet, dass der Frequenzbereich, in welchem ein Neuron Informationen verarbeiten kann, nach oben begrenzt ist. Die Grenzfrequenz hängt sowohl vom Membranwiderstand (R) und von der Membrankapazität (C) ab. R und C bestimmen die Membranzeitkonstante, welche ihrerseits von Zelltyp zu Zelltyp im unteren Millisekundenbereich stark variieren kann. Resonanz in einem elektrischen Schaltkreis entsteht, wenn dem parallelen RC-Glied eine Induktivität parallel geschaltet wird (Abb. 4C, Koch, 1984; Hutcheon & Yarom, 2000; Erchova et al., 2004).

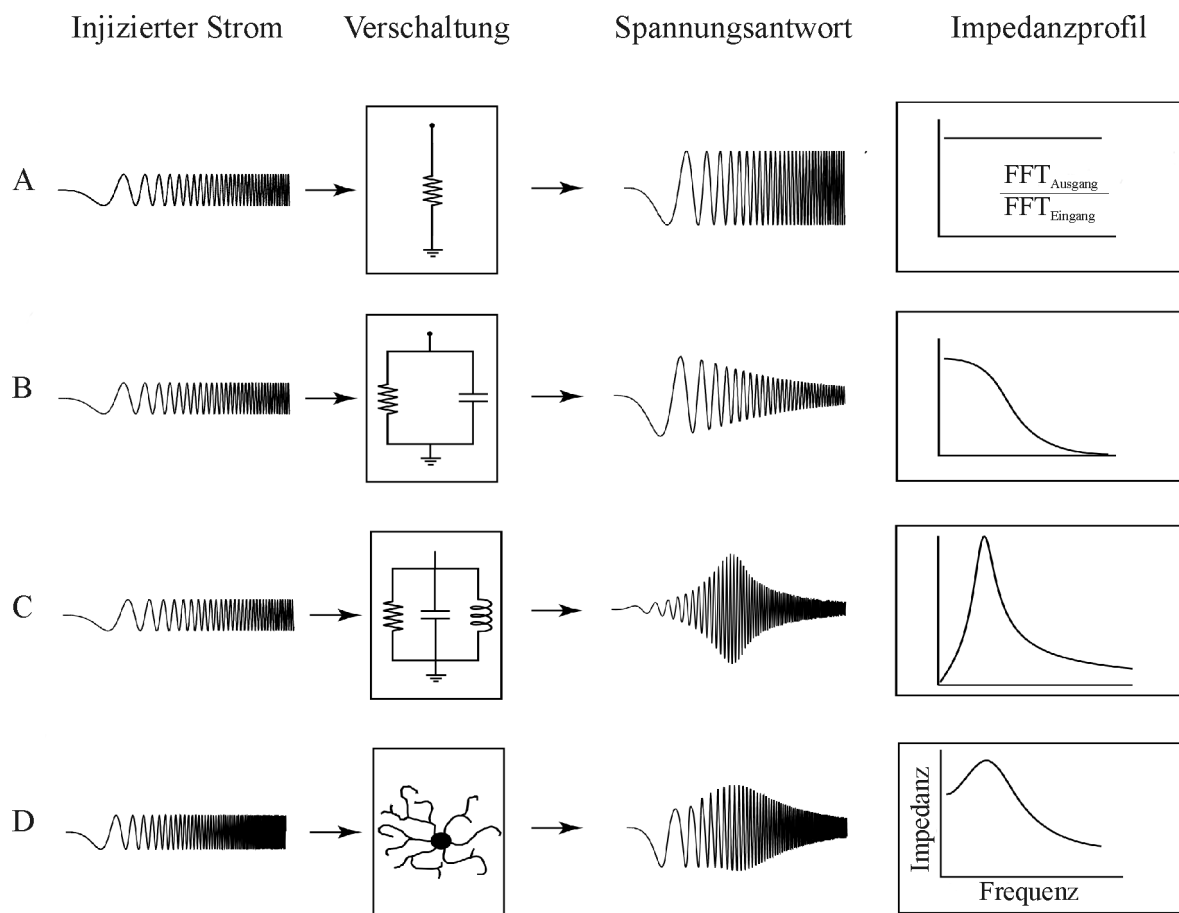


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Mechanismen von Resonanz. Hier wird gegenübergestellt, welche elektrische Verschaltung wie auf eine sinusförmige Strominjektion mit linear steigender Frequenz reagiert. A) Ohmscher Widerstand, B) paralleles RC-Glied, C) paralleles RCL-Glied, D) Neuron (Darstellung modifiziert nach Hutcheon & Yarom, 2000).

Dem induktiven Element entsprechen im realen Neuron spannungsabhängige Ionenkanäle, die zum Spannungsverlauf zeitversetzt aktiviert werden (zum Beispiel sogenannte *Delayed Rectifier*). Im Gegensatz zur Resonanz können MPOs direkt am Ruhemembranpotential oder bei unterschwelliger Gleichstrominjektion beobachtet werden. Die Frequenz dieser MPOs korreliert eng mit der Resonanzfrequenz, wenn beide Phänomene beobachtet wurden, so dass vermutet wird, dass sich MPOs und Resonanz auf ähnliche zelluläre Eigenschaften zurückführen lassen (Erchova et al., 2004).

1.5 RELEVANZ VON RESONANZ FÜR NETZWERKOSZILLATIONEN

In verschiedenen Abschnitten der hippocampalen Formation können Netzwerkoszillationen in Frequenzbändern beobachtet werden, in denen sich auch Resonanz findet. Die CA3 Region kann zum Beispiel Netzwerkoszillationen sowohl im θ - (4-15 Hz) als auch im γ -Bereich (30-100 Hz) erzeugen (zum Beispiel Boehlen et al., 2009). Durch pharmakologische Aktivierung von

Kainatrezeptoren können beide Oszillationen *in vitro* erzeugt werden, wobei die Präparationstechnik eine Rolle spielt (Gloveli et al., 2005a). Das bedeutet, dass ein bestimmtes Netzwerk mehrere verschiedene Oszillationen generieren kann, und demzufolge die genaue Verschaltung durch Elemente wie Rückkoppelung zwar Oszillationen begünstigen kann, die Frequenz und Kohärenz der Oszillationen aber im Wesentlichen von den aktivierten Eingängen abhängen. Es wird allgemein angenommen, dass Netzwerkoszillationen sowohl von synaptischen Interaktionen zwischen erregenden Pyramidenzellen und hemmenden Interneuronen als auch von der Interaktion von Interneuronen untereinander abhängen (Bartos et al., 2002; Traub et al., 2004; Bartos et al., 2007; Wulff et al., 2009). Insbesondere ist die Aktivität von Interneuronen entscheidend für die Aufrechterhaltung von γ -Oszillationen (Fisahn et al., 1998; Whittington et al., 1998; Hajos et al., 2000; Traub et al., 2003; Bartos et al., 2007). Aufgrund dieser synaptischen Interaktionen sind während eines Oszillationszyklus viele Interneurone in bestimmten Phasenrelationen zugleich aktiv (Klausberger & Somogyi, 2008). Es ist jedoch im Moment nicht klar, welcher genaue Interneuronentyp für welchen Aspekt der Netzwerkoszillationen entscheidend ist, da es bislang experimentell nicht möglich ist, einen individuellen Interneuronentyp zuverlässig aus dem Netzwerk zu entfernen. Es sind jedoch nicht nur die synaptischen Interaktionen, die Netzwerkoszillationen bedingen können. Die einzelnen, interagierenden Neurone können ihrerseits, wie bereits beschrieben, Oszillatoren oder resonant sein (zur Übersicht Buszáki & Draguhn, 2004). Das ist insbesondere für Netzwerkoszillationen im θ -Bereich relevant, da die meisten resonanten Zellen hier ihre Eigenfrequenz haben.

1.6 FÜR RESONANZ RELEVANTE IONENLEITFÄHIGKEITEN

Das Membranpotential einer Zelle ändert sich, wenn sich die Ionenleitfähigkeiten der Membran ändern. Die im Gehirn am häufigsten vorkommenden monovalenten Kationen sind Kalium- und Natriumionen. Resonanz entsteht aus dem Wechselspiel zwischen passiven (Leckleitfähigkeiten, Membrankapazität) und aktiven (zeitabhängige, spannungsgesteuerte Ionenkanäle) Membraneigenschaften der Zelle, wobei die passiven Membraneigenschaften, wie oben erwähnt, als Tiefpassfilter wirken.

Es kommen von der Vielfalt der unterschiedlichen Ionenleitfähigkeiten nur die in Frage, die einem induktiven Element entsprechen, das heißt, aktiv Veränderungen im Membranpotential entgegenwirken (Hutcheon & Yarom, 2000). Das gilt für alle Leitfähigkeiten, deren Umkehrpotential nahe dem Fußpunkt ihrer Aktivierungskurve liegt. Eine weitere Bedingung ist eine – in Relation zur Membranzeitkonstante – langsame Aktivierung der Leitfähigkeit. Dadurch kann eine solche Leitfähigkeit der Zelle die Eigenschaften eines Hochpassfilters verleihen. Das Neuron ist dann außerdem empfänglicher für die schnelle Entladung von mehreren APs (Llinás,

1988; Hutcheon & Yarom, 2000). In der hippocampalen Formation kommen hauptsächlich drei unterschiedliche spannungsabhängige Kationenströme in Frage: der M-Strom (I_M), der H-Strom (I_h) und der persistierende Natriumstrom (I_{NaP}). Dem I_M und dem I_h wird die Resonanz *per se* zugeschrieben, während vom I_{NaP} angenommen wird, dass er sie verstärken kann ohne die Resonanzfrequenz zu verändern, da sein Umkehrpotential nahe dem Maximum der Aktivierungskurve liegt (Gutfreund et al., 1995; Hutcheon & Yarom, 2000).

In der hippocampalen Formation zeigen eine Vielzahl von Zellen Resonanz und/oder MPOs (Gutfreund et al., 1995; Chapman & Lacaille, 1999; Pike et al., 2000; Fellous et al., 2001; Hu et al., 2002) und es existieren Hinweise, dass diese von der Expression von I_h , I_M und I_{NaP} abhängen (Llinás & Yarom, 1986; Alonso & Llinás, 1989; Hu et al., 2002; Erchova et al., 2004; Orban et al., 2006; Haas et al., 2007; Nolan et al., 2007). Funktionell relevante Netzwerkoszillationen in der hippocampalen Formation könnten also von neuronaler Resonanz unterstützt werden, wobei diese von spezifischen Leitfähigkeiten abhängt.

1.6.1 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Die Spannungsabhängigkeit eines Ionenkanals ist entscheidend dafür, ob er Resonanz unterstützen kann. Ionenkanäle sind Membranproteine, welche die Permeabilität der Membran für spezifische Ionen kontrollieren. Spannungsabhängige Ionenkanäle sind selektiv permeabel für eine Vielzahl physiologisch relevanter Ionen (Kalium, Natrium, Calcium, Chlorid). Sie liegen der neuronalen Erregbarkeit zugrunde und sind verantwortlich für die Signalgenerierung und die Informationsweiterleitung im gesamten Nervensystem. Eigenschaften, Dichte und die spezifische Lokalisation in der Zelle legen die Funktion eines Kanals in der Signalverarbeitung fest. Die Modulation von Ionenkanälen spielt bei komplexen Gehirnprozessen wie zum Beispiel Lernen eine wichtige Rolle.

1.6.2 Eigenschaften spannungsabhängiger Kaliumkanäle

Spannungsabhängige Kaliumkanäle (K_v) bilden die größte und die am breitesten gefächerte Ionenkanalfamilie. Bisher wurden über 100 verschiedene Untereinheiten der individuellen Kaliumkanaltypen identifiziert. Diese zeigen unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Spannung und/oder intrazellulären Botenstoffen. Darüber hinaus weisen sie verschiedene Kinetiken und pharmakologische Eigenschaften auf und besitzen individuelle Expressionsmuster, welche sich je nach Gewebe unterscheiden können. Die Aufklärung der Primärstruktur der spannungsabhängigen Kaliumkanäle mittels molekularbiologischer Methoden wurde mit der sogenannten *Shaker*-Sequenz in dem Tiermodell *Drosophila melanogaster* eingeleitet. Später erfolgte die Klonierung weitere Gene wie *Shab*, *Shaw* und *Shal* und in einer

1. Einleitung

alternativen Nomenklatur bei Vertebraten Kv1, Kv2, Kv3 und Kv4 (Wei et al., 1990). Die Kaliumkanalproteine bestehen aus sechs membrandurchspannenden Segmenten (Abb. 5), wobei der N- und C-Terminus auf der zytoplasmatischen Seite zu liegen kommt. Traditionell werden Kv-Kanäle hinsichtlich ihrer Spannungsabhängigkeit-, ihres Inaktivierungsverhalten und der Pharmakologie in drei Familien eingeteilt.

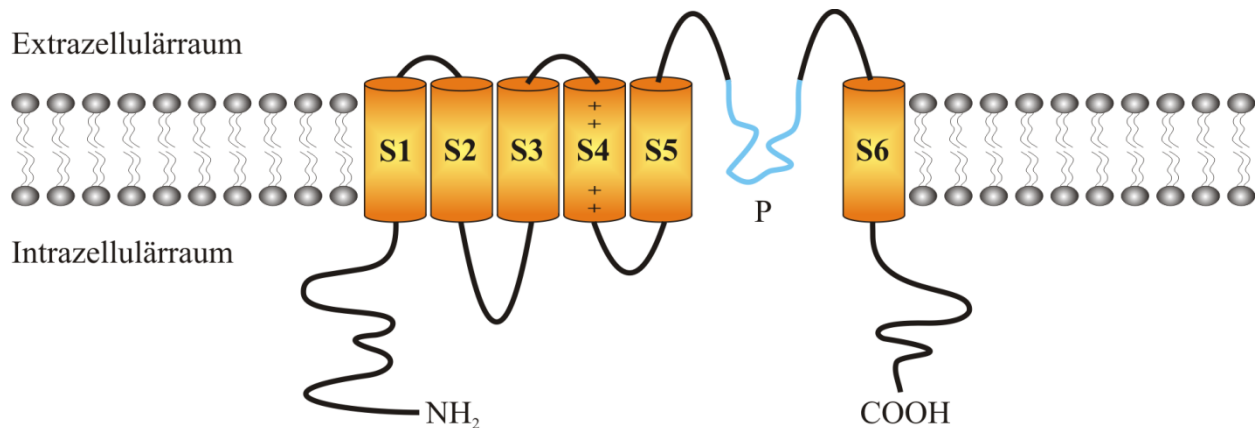


Abbildung 5: Typische Struktur eines spannungsabhängigen Kaliumkanals. Er besteht aus sechs Transmembrandomänen, wobei der Abschnitt zwischen S5 und S6 die Kanalpore bildet. Die Spannung wird von der Transmembrandomäne S4 detektiert.

In hippokampalen Neuronen lassen sich bei den spannungsaktivierten Auswärtsströmen der I_K vom Typ des verzögerten Gleichrichters, der A-Strom (I_A) und der D-Strom (I_D) unterscheiden (Numann et al., 1987; Heinemann et al., 1992). Die Familie der verzögerten Gleichrichter (*Delayed Rectifier*) aktiviert langsam bei einer Membrandepolarisation ohne eine schnelle Inaktivierung aufzuweisen (> 100 ms). Das klassische Beispiel hierfür ist der 1952 von Hodgkin und Huxley beschriebene Kaliumstrom im Riesenaxon des Tintenfisches (Hodgkin & Huxley, 1952). Ein weiterer transienter, spannungsaktivierter Kaliumkanal (I_A) öffnet und schließt sich während der Depolarisation außerordentlich rasch (< 100 ms) und verursacht so kurzfristig einen repolarisierenden Kaliumausstrom. Er wird erst durch Hyperpolarisation erneut aktivierbar und ermöglicht dadurch Salven von APs (Connor & Stevens, 1971). I_D gleicht I_K in seiner langsamen Inaktivierungskinetik, aktiviert jedoch wesentlich schneller und bereits bei Membranpotentialen von -70 mV, also weit unterhalb der Schwelle zur AP-Auslösung (Storm, 1988). Daher wird ihm ein Beitrag zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials nachgesagt. Darüber hinaus ist I_D an der Repolarisationsphase des APs beteiligt und kann die Auslösung von APs verzögern.

Eine wichtige Familie von Kaliumkanälen wird durch den intrazellulären Botenstoff Calcium aktiviert. Im ZNS beeinflussen Calcium-abhängige Kaliumkanäle die neuronale Aktivität durch Kontrolle der Erregbarkeit, der tonischen Entladungsfrequenz, der Adaptation der AP-Frequenz

und der AP-Repolarisation. Es wird angenommen, dass die I_{KCa} -Aktivierung die langsame Nachhyperpolarisationen (sAHP) begünstigt, welche dem Calciumeinstrom nach APs folgt. Die sAHP liegt der Adaptation der AP-Frequenz auf andauernde Stimuli zugrunde, wohingegen die Apamin-sensitive mittlere AHP (mAHP) die AP-Frequenz auf einen Stimulus reguliert (Stocker et al., 1999; Stocker, 2004; Bond et al., 2005; Faber & Sah, 2007). Die schnelle Nachhyperpolarisation (fAHP) wird während eines depolarisierenden Spannungskommandos oder durch die Repolarisationsphase eines APs aktiviert. Die verschiedenen AHP-Formen werden einzelnen Kanälen zugeordnet.

Es sind bisher drei Typen von Calcium-abhängigen Kaliumströmen bekannt, welche nach ihrer Leitfähigkeit unterteilt werden: klein (SK), intermediär (IK) und groß (BK). Diese Kanaltypen unterscheiden sich außerdem in ihren pharmakologischen Eigenschaften und ihrer Kinetik. Sie sind im ganzen ZNS anzutreffen (Kohler et al., 1996; Stocker et al., 1999; Pedarzani & Stocker, 2008). BK-Kanäle sind an der fAHP beteiligt (Storm, 1990). Die mAHP als auch die sAHP werden durch gemischte Leitfähigkeiten vermittelt (Pedarzani & Stocker, 2008).

1.6.3 Der KCNQ-Kanal

Eine Leitfähigkeit, die möglicherweise Voraussetzung für Resonanz ist, stellt der M-Strom (I_M) dar. Es handelt sich hierbei um einen Strom, der durch spannungsabhängige, langsam aktivierende und nicht inaktivierende Kaliumkanäle fließt. Die ersten Beobachtungen in Neuronen des Sympathikus des Frosches ergaben (Brown & Adams, 1980), dass diese speziellen Kanäle sensitiv gegenüber Muskarin sind, welches eine Zunahme der neuronalen Erregbarkeit durch Unterdrückung des I_M verursacht. Der I_M wurde seitdem in unterschiedlichen Spezies und in verschiedenen Neuronen des ZNS beschrieben. Die muskarinerge Unterdrückung des I_M ist an der epileptogenen Aktivität des Muskarinrezeptor-Agonisten beteiligt. Die Offenwahrscheinlichkeit des Kv7/KCNQ/M-Kanals kann durch eine Vielzahl von Neurotransmittern, darunter zum Beispiel Acetylcholin, moduliert werden. Dem I_M liegen Homo- und Heteromere von KCNQ-Untereinheiten (KCNQ2, 3 und 5) zugrunde (Shah et al., 2002; Hadley et al., 2003). Mutationen dieser Untereinheiten führen schon bei einer Reduzierung des I_M um 25 % zu benignen Neugeborenenkrämpfen (BCNF) (Biervert et al., 1998; Singh et al., 1998; Lerche et al., 1999; Jentsch, 2000; Schroeder et al., 1998, 2000).

Aktivatoren dieser Kanäle wie zum Beispiel Retigabin sind potente Antikonvulsiva, da sie die neuronale Erregbarkeit reduzieren (Rundfeldt, 1997; Hetka et al., 1999; Hu et al., 2007). Der I_M ist aktiv um das Schwellenpotential und reguliert somit das Entladungsmuster von Neuronen (Delmas & Brown, 2005). Der axonale I_M ist insbesondere für die Frequenzadaptation von hippokampalen Pyramidenzellen von Bedeutung (Otto et al., 2002; Yue & Yaari, 2004; Shah et

al., 2008). Er trägt weiterhin zu der mAHP, der Nachdepolarisation (DAP) (Yue & Yaari, 2004; Gu et al., 2005; Peters et al., 2005) und zu der Entstehung von hippokampalen θ -Oszillationen bei (Brown & Adams, 1980; Halliwell & Adams, 1982; Brown, 1988; Suh et al., 2004). Außerdem wird Resonanz von hippokampalen Pyramidenzellen im θ -Bereich von I_M -Modulatoren und durch Veränderung der KCNQ-Expression verändert (Hu et al., 2002; Peters et al., 2005).

1.6.4 Der HCN-Kanal

Die durch Hyperpolarisation aktivierten Kationenströme (HCN, I_h) wurden in einer Vielzahl von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in nichtneuronalen Geweben gefunden wie zum Beispiel in Photorezeptoren (Bader et al., 1979, zur Übersicht Kaupp & Seifert, 2001), im Sinusknoten des Säugerherzens (Brown et al., 1979), in der glatten Muskulatur des lymphatischen Gewebes (McCloskey et al., 1999) und in bipolaren Zellen der Retina (Müller et al., 2003).

Im Gegensatz zu vielen anderen spannungsgesteuerten Kanälen aktivieren HCN-Kanäle bei Hyperpolarisation. Daher wurden die Ströme anfangs als I_h (hyperpolarisationsaktiviert), I_f (*Funny*) oder I_q (*Queer*) bezeichnet. Vor einigen Jahren gelang die Identifikation der Gene, die für HCN-Kanäle kodieren. In Säugetieren wurden vier Gene identifiziert. Die Isoformen werden mit HCN1 bis HCN4 bezeichnet und unterscheiden sich in ihrer Verteilung und biophysikalischen Eigenschaften, zum Beispiel der Aktivierungskurve und der Kinetik ihrer Ströme (Gauß et al., 1998; Ludwig et al., 1999; Moosmang et al., 1999; Santoro et al., 2000).

Die Struktur der HCN-Kanäle weist große Ähnlichkeiten mit spannungsabhängigen Kaliumkanälen des *Shaker*-Typs und anderen durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kanälen (CNG-Kanälen) auf. Die Topologie einer HCN-Untereinheit zeigt sechs transmembrane Segmente mit einer Porenschleife zwischen Segment S5 und S6 sowie einem Spannungssensor in Segment S4. Die Porenregion enthält ein GYG (Glyzin-Thyrosin-Glyzin) Selektivitätsmotiv, wie es auch für Kaliumkanäle beschrieben wurde. Die N- und C-Termini liegen intrazellulär. Der C-Terminus enthält eine Bindestelle für zyklische Nukleotide. Vier solcher Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal (zur Übersicht Santoro & Tibbs, 1999; Biel et al., 2002).

Die spannungsabhängige Aktivierung des HCN-Kanals erfolgt bei Hyperpolarisation der Membran und lässt sich sehr gut mit einer Boltzmannfunktion beschreiben. Die halbmaximale Aktivierung erfolgt je nach Isoform in verschiedenen Expressionssystemen zwischen -60 und -80 mV (zur Übersicht Kaupp & Seifert, 2001). Der HCN-Strom entwickelt sich bei Hyperpolarisation der Membran mit sigmoidalem Zeitverlauf. Die Aktivierungskinetik ist grundsätzlich relativ langsam und unterscheidet sich zwischen den Isoformen. HCN1 aktiviert

am schnellsten, gefolgt von HCN2 und HCN3, während HCN4 am längsten für die Aktivierung benötigt. Die Bindung zyklischer Nukleotide (zum Beispiel cAMP und cGMP) an die HCN-Kanäle verändert die Spannungsabhängigkeit ihrer Aktivierung. Die Aktivierungskurve wird durch mikromolare Konzentrationen zu positiveren Spannungen hin verschoben. Der Grad der Modulierbarkeit unterscheidet sich zwischen den Isoformen. Die halbmaximale Aktivierungsspannung wird bei HCN1 nur um etwa 2-5 mV verschoben, bei den anderen Isoformen jedoch 10 bis 20 mV (Ludwig et al., 1998, 1999; Chen et al., 2001).

HCN-Kanäle leiten hauptsächlich Kalium- und Natriumionen. Das Verhältnis der Leitfähigkeit von Natrium und Kalium bewegt sich zwischen 0.1 und 0.4 (Wollmuth & Hille, 1992; Richter et al., 2000; Aponte et al., 2006). Unter physiologischen Bedingungen haben die Ströme durch HCN-Kanäle daher ein Umkehrpotential von etwa -30 mV. Das führt dazu, dass der HCN-Strom in Neuronen gewöhnlich einen depolarisierenden Effekt hat.

Wie viele Kaliumkanäle, zeigen HCN-Kanäle eine spannungsabhängige Blockade durch millimolare Cäsiumkonzentrationen (DiFrancesco, 1982). Neben Cäsium blockieren einige organische Komponenten HCN-Kanäle. Neben Zatebradine und anderen ist ZD7288 der am häufigsten verwendete, irreversible Inhibitor von I_h (Gasparini & DiFrancesco, 1997; Satoh & Yamada, 2002; Chen et al., 2007), der jedoch nicht zwischen den vier Isoformen unterscheiden kann. Ein spezifischer und reversibler Blocker für HCN-Kanäle ist bis heute nicht bekannt.

Funktionell spielen HCN-Kanäle eine herausragende Rolle als Schrittmacherkanäle. Besonders gut verstanden ist ihre Rolle bei der Entstehung des Herzrhythmus der Wirbeltiere. Dort kommen HCN-Kanäle in spezialisierten Herzmuskelzellen des Sinusknotens vor und sind essentiell für den Herzschlag. Beispiele für die Rolle von HCN-Kanälen im ZNS reichen von Neuronen des Thalamus, die in Abhängigkeit vom Schlaf-Wachrhythmus, die Weiterleitung von Informationen in den Kortex regulieren (zur Übersicht Lüthi & McCormick, 1998; Robinson & Siegelbaum, 2003), bis zur Modulation der postsynaptischen Integration und der Steuerung der Neurotransmitterfreisetzung im Hippokampus (Magee, 1999; Mellor et al., 2002). Eine weitere, allgemeine Funktionen von HCN-Kanälen ist ihr Beitrag beim Einstellen des Ruhemembranpotential und des Membranwiderstands (zur Übersicht Robinson & Siegelbaum, 2003).

1.6.5 Der persistierende Natriumstrom

Natriumkanäle können wie eine Vielzahl anderer Kanäle ganz allgemein in liganden- und spannungsabhängige Natriumkanäle unterteilt werden. Spannungsabhängige Natriumkanäle spielen bei der Ausbildung und Fortleitung von APs eine entscheidende Rolle und ermöglichen so erst die Informationsübertragung im Nervensystem (Hodgkin & Huxley, 1952; Llinás, 1988;

French et al., 1990; Alzheimer et al., 1993; Crill, 1996; Su et al., 2001; Yue et al., 2005; Astman et al., 2006). Sie sind sowohl auf erregbaren als auch auf nicht erregbaren Zellen wie Gliazellen zu finden (Black et al., 1995).

Man unterscheidet transiente und persistierende Natriumströme (Crill, 1996). Obwohl die persistenten Natriumströme (I_{NaP}) weniger als 1 % ausmachen, haben sie eine große Bedeutung. Der persistierende Natriumstrom inaktiviert im Vergleich zu transienten nicht, was einen kontinuierlichen, depolarisierenden Strom zur Folge hat. Der persistierende Natriumstrom reguliert dadurch die neuronale Erregbarkeit, indem er das Schwellenpotential für erneute Depolarisation festlegt (Alzheimer et al., 1993; Crill, 1996). Die funktionelle Bedeutung von I_{NaP} liegt darin begründet, dass er innerhalb eines Spannungsbereiches aktiv ist, in welchem die meisten anderen spannungsgesteuerten Natriumströme noch inaktiv sind. Er wird bei Membranpotentialen aktiv, die einen um etwa 10 mV negativeren Wert haben als das Aktivierungspotential des transienten Natriumstroms (Crill, 1996). I_{NaP} wird in Hinsicht auf Resonanzphänomene als Verstärker betrachtet und ist in vielen Neuronen des ZNS demonstriert worden (Hu et al., 2002; Wang et al., 2006). Das Pharmakon Losigamon entstand in einer breit angelegten Studie. Es ist der bisher der einzige Inhibitor, der spezifisch den persistierenden aber nicht den transienten Natriumstrom blockieren kann (Gebhardt et al., 2001).

1.7 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT

Im Fokus dieser Arbeit stand die elektrophysiologische und pharmakologische Charakterisierung oszillatorischer Aktivität sowohl auf Einzelzellebene als auch auf Netzwerkebene in der hippocampalen Formation der adulten Ratte *in vitro*. Ausgehend von Befunden aus theoretischen Modellen, die auf eine Beteiligung des M-Stroms und des H-Stroms hindeuten, sollte deren Rolle bei der Entstehung und ihre Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Oszillationen experimentell untersucht werden. Darüber hinaus war von Interesse, in welchem Maße diese intrinsische Zelleigenschaften determinieren.

Der mEC spielt eine tragende Rolle in der neuronalen Informationsverarbeitung in Hinblick auf die räumliche Wahrnehmung (O'Keefe & Burgess, 2005) und das episodische Gedächtnis (Eichenbaum & Lipton, 2008). Eine große Anzahl der Neurone in der Schicht II des EC der Ratte sind sogenannte Rasterzellen, welche APs generieren, wenn sich die Ratte an einem bestimmten Bereich des Raumes aufhält (Hafting et al., 2005). Es ist bekannt, dass die Feldzwischenräume innerhalb der einzelnen hexagonalen Raster mit der anatomischen Position der Zellen entlang der dorso-ventralen Achse des EC korrelieren. Um ein tieferes Verständnis über die positionsabhängige Signalverarbeitung zu erlangen, sollte zunächst geklärt werden, inwieweit elektrophysiologische Eigenschaften von Sternzellen der Schicht II im mEC von der Zellposition abhängen. Dabei wurde zwischen passiven und aktiven Membraneigenschaften wie zum Beispiel der neuronalen Erregbarkeit und der Resonanz unterschieden. Im Weiteren sollte abhängig von den erhaltenen Befunden untersucht werden, welche der bereits erwähnten Leitfähigkeiten dieser Positionsabhängigkeit zugrunde liegen. Hierbei erhaltene Korrelationen zwischen Leitfähigkeiten und Zelleigenschaften sollten durch pharmakologische Experimente verifiziert werden. Da die Aktivität der zugrundeliegenden Kanäle stark vom Membranpotential abhängt, sollte auch dieser Zusammenhang studiert werden, um einen besseren Einblick in die Dynamik der neuronalen Signalintegration zu erhalten. Einige der in Betracht kommenden Leitfähigkeiten zeigen darüber hinaus eine deutliche altersabhängige Expression. Es war daher ebenfalls von Interesse, ob und, wenn ja, wie positionsabhängige Zelleigenschaften während der postnatalen Entwicklung modifiziert werden.

Im Weiteren sollte die Fragestellung auf andere Regionen der hippocampalen Formation ausgeweitet werden. Hier galt es zu überprüfen, ob die Assoziation zwischen Leitfähigkeit und Zelleigenschaft ein globaleres Phänomen ist. So wird zum Beispiel allgemein angenommen, dass unterschwellige MPOs und die Initialhyperpolarisation eine Grundvoraussetzung für Resonanz darstellt. Es ist interessant, dass ebenso wie entorhinale Sternzellen viele Typen von Neurone und Interneuronen im Hippokampus diese elektrophysiologischen Merkmale aufweisen. Es stellt sich daher die Frage, ob auch die Mehrzahl dieser Zellen resonant sind und, wenn ja, wie sie sich

von nicht resonanten Zellen unterscheiden. Insbesondere sollte herausgefunden werden, ob eine Verstärkung des M-Stroms Einfluss auf das Resonanzverhalten von Pyramidenzellen der CA1 Region hat.

Nach der Untersuchung von neuronaler Aktivität auf der Ebene der Einzelzelle sollten die erhobenen Befunde im Weiteren auf die Netzwerkebene übertragen werden. Komplexere, funktional bedeutsame Aktivitätsmuster wie die γ - und θ -Oszillationen werden durch eine Reihe von Mechanismen unterstützt. Der Beitrag der zuvor erwähnten Leitfähigkeiten zu diesen Netzwerkoszillationen sollte durch pharmakologische Experimente charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERSUCHSTIERE

Das akute Hirnschnittpräparat ermöglicht es, elektrophysiologische Messungen an Zellen in strukturell definierter Umgebung durchzuführen. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden je nach experimentellen Anforderungen 20 Tage (P20, postnatal) bis 12 Wochen alte Wistar Ratten beiden Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden von *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Deutschland) gezüchtet und in die zentrale Versuchstierhaltung der Charité überführt. Hier wurden sie unter standardisierten Bedingungen, bei 12-stündigem Tag-Nacht-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die Tötung der Tiere ist von der zuständigen Behörde genehmigt worden (T0068/02). Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere wurde durch entsprechende Versuchsplanung minimiert.

2.2 PRÄPARATION VON AKUTEN HIRNSCHNITTEN

Die Tiere wurden mit Diethyläther (Roth, Karlsruhe, Deutschland) anästhesiert und mithilfe eines Fallbeils dekapitiert. Mit einem Skalpell wurde die Kopfhaut dorso-medial zerteilt und vom Schädeldach abgelöst. Die am Schläfenbein ansetzende Masseterenmuskulatur wurde durchtrennt und die Okzipitalplatte samt Teilen des Kleinhirns mit dem Skalpell abgesetzt. Die so geschaffene Schädelöffnung erlaubte es, nachdem mithilfe einer scharfen Knochenzange durch laterale Einschnitte die Schädelkalotte gelockert wurde, diese nach rostral wegzuklappen ohne kortikale Strukturen zu verletzen. Mit einer Duraschere (World Precision Instruments, Sarasota, USA) wurde die *Dura mater* geöffnet und zur Seite hin abgezogen. Das Gehirn wurde dann mit einem gebogenen Spatel an der rostralen Schnittfläche ansetzend vorsichtig aus der Schädelgrube gehoben. Um die Stoffwechselvorgänge während der weiteren Präparationsschritte zu verlangsamen und das Gewebe optimal zu erhalten, wurde es für ungefähr 1 Minute (min) in ein mit eisgekühlter und oxygenierter, artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit (ACSF, artificial cerebrospinal fluid; ~ 4 °C) gefülltes Becherglas gegeben. Das Gehirn wurde nach dieser kurzen Abkühlung auf eine ebenfalls gekühlte Arbeitsfläche gelegt, die verbliebenen Kleinhirnanteile entfernt und die Hemisphären mit einer Rasierklinge durch einen medianen Sagittalschnitt vollständig voneinander getrennt. Beide Hemisphären wurden mit einem feinen Haarpinsel vorsichtig auf die Medianfläche gekippt. Das weitere Vorgehen hing davon ab, ob horizontale oder koronare Schnitte angefertigt werden sollten.

Für horizontale Schnitte wurde mit einem Transversalschnitt ein dorsaler Teil beider Hemisphären entfernt. Die Hemisphären wurden jetzt mithilfe von Filterpapierstreifen in die Schneidekammer überführt und mit der zuletzt entstandenen Schnittfläche auf einen mit Cyanacrylatklebstoff (UHU-Sekundenkleber®, Bühl, Germany) bedeckten Präparierblock aus

Polyvinylchlorid geklebt. Die Orientierung hing vom Versuchstyp ab. Für Messungen von γ -Oszillationen wurde eine fronto-okzipitale und für Experimente mit Dextranamin-gefärbten CA1 Interneuronen eine temporal-septale Schnittrichtung und ein Schnittwinkel von 12° verwendet. Für alle weiteren Ableitungen wurden die Schnitte planar und in temporal-septaler Richtung angefertigt. Um koronare Schnitte zu erhalten, wurden die Hemisphären nach einem Frontalschnitt wie bereits beschrieben auf die Schnittfläche geklebt. Es wurde eine dorso-ventrale Schnittrichtung ohne Winkel verwendet. Die Schneidekammer wurde nun mit gekühltem, oxygenierten ACSF gefüllt. Mit einem Vibratom von Campden Instruments Limited (752M Vibroslice, Loughborough, UK) wurden Hirnschnittpräparate mit einer Dicke von 400 μm angefertigt.

Für *Patch-Clamp*-Ableitungen wurden die Schnitte bis zum Experiment bei Raumtemperatur ($20\text{--}24^\circ\text{C}$) in ACSF aufbewahrt. Das Aufbewahrungsgefäß war in sechzehn Bereiche unterteilt, um die topographische Information der Gehirnschnitte zu bewahren. Für extrazelluläre Feldpotentialableitungen wurden die Hirnschnitte in einer Phasengrenzflächen (*Interface*)-Kammer bei 34°C gelagert.

2.3 LÖSUNGEN UND PHARMAKA

Als Nährmedium während der Präparation, der Equilibrierungs- und auch der Experimentierphase diente ACSF, das in folgender Zusammensetzung (in mM) weitestgehend dem Liquor der Ratte entspricht: 129 NaCl, 21 NaHCO_3 , 3 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 1.6 CaCl_2 , 1.8 MgSO_4 , und 10 Glucose. Die Osmolarität wurde in einem Gefrierpunkt-Osmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) kontrolliert und betrug 300 ± 5 mOsmol/l. Die Perfusionslösung wurde durch Begasung mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) gesättigt. Unter Begasung betrug der pH-Wert bei 34°C aufgrund des Bicarbonat-Phosphat-Puffers 7.40 ± 0.05 . Die zur akuten Badapplikation verwendeten Substanzen wurden, wie in der Produktinformation des jeweiligen Herstellers beschrieben, aus Trockensubstanzen zu Stammlösungen verarbeitet. Sie wurden meist 30 min vor Beginn der Experimente auf die gewünschte Konzentration im ACSF verdünnt. Aus ökonomischen Gründen wurden einige Substanzen für nachfolgende Experimente wiederverwendet. Für die pharmakologischen Untersuchungen wurden folgende Substanzen verwendet: 5-10 μM ICAGEN-110381 (4-Chlor-N-(6-chlor-pyridin-3-yl)-benzamid, Elbion, Radebeul, Deutschland), 50-200 μM Losigamon (Dr. Willmar Schwabe GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in Bidest. gelöst, 250-1000 nM Retigabin (2-Amino-4-(4-fluoro-benzylamino)-phenyl-carbaminidethylester, Elbion, Radebeul, Deutschland), 2-10 μM XE991 (10,10-bis(4-pyridinylmethyl)-9(10H)-anthrachinon-dihydrochlorid, Tocris Bioscience, Bristol, UK) and 10-50 μM ZD7288 (4-ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methylaminopyrimidiniumchlorid, Tocris

Bioscience, Bristol, UK). Zur Registrierung postsynaptischer Ströme wurden 1 μM TTX (Tetrodotoxin), 10 μM Bicucullin (1(S),9(R)-(-)-Bicucullinmethyljodid) und 10 μM CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion, Tocris Bioscience, Bristol, UK) verwendet. Zusätzlich wurden folgende weitere Pharmaka verwendet: 60 μM DL-APV (DL-2-amino-5-phosphonopentansäure, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 10 μM DNQX (6,7-Dinitroquinoxalin-2,3-dion, Tocris Bioscience, Bristol, UK), und 5 μM Gabazin (SR-95531, 4-[6-imino-3-(4-methoxyphenyl)pyridazin-1-yl]-butansäure Hydrobromid, Tocris Bioscience, Bristol, UK).

2.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE ABLEITUNGEN

2.4.1 Ganzzellableitung

Ableitungen wurden von hippokampalen Pyramidenzellen der Region CA1 innerhalb der Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*), von Interneuronen im *Stratum radiatum* und von Zellen der Schicht II des mEC durchgeführt. Die verwendeten Ableitelektroden sind Mikroelektroden mit einem Spitzendurchmesser von 1-3 μm . Diese wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren (Science Product GmbH, Hofheim, Deutschland) mithilfe eines Elektrodenausziehgerätes (PC-10, Narishige, London, UK) hergestellt und mit einer intrazellulären Lösung (K-Glukonat 140 mM, MgCl_2 2 mM, Phosphokreatin 10 mM, Na_2ATP 2 mM, NaGTP 0.4 mM, and HEPES 10 mM oder CsCl 130 mM, MgCl_2 2 mM, Na_2ATP 2 mM, NaGTP 0.3 mM, HEPES 10 mM und EGTA 2 mM, pH = 7.3 mit KOH oder CsOH eingestellt) gefüllt. In einigen Experimenten wurden zu der intrazellulären Lösung 0.5 % Biocytin beigemischt. Der Pipettenwiderstand betrug 4-6 M Ω .

Abbildung 6 verdeutlicht schematisch die wichtigsten Komponenten des Versuchsaufbaus. Die Positionierung der *Patch*-Pipette erfolgte mithilfe eines Mikromanipulators (PI, Karlsruhe, Deutschland) und konnte mit einem aufrechten Mikroskop (Zeiss Axioskop FS, Deutschland), das mit einem Phasenkontrastobjektiv (Wasserimmersionsobjektiv, Zeiss 40x/2,075 Ph2) mit 40facher Vergrößerung und einer Kamera (Hamatsu C2400-07, Hamamatsu City, Japan) ausgestattet war, optisch kontrolliert werden. Zusammen mit dem der Kamera vorgeschalteten Vergrößerungswechsler mit einem *C-Mount*-Adapter (Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland) ergab sich eine 80fache Gesamtvergrößerung.

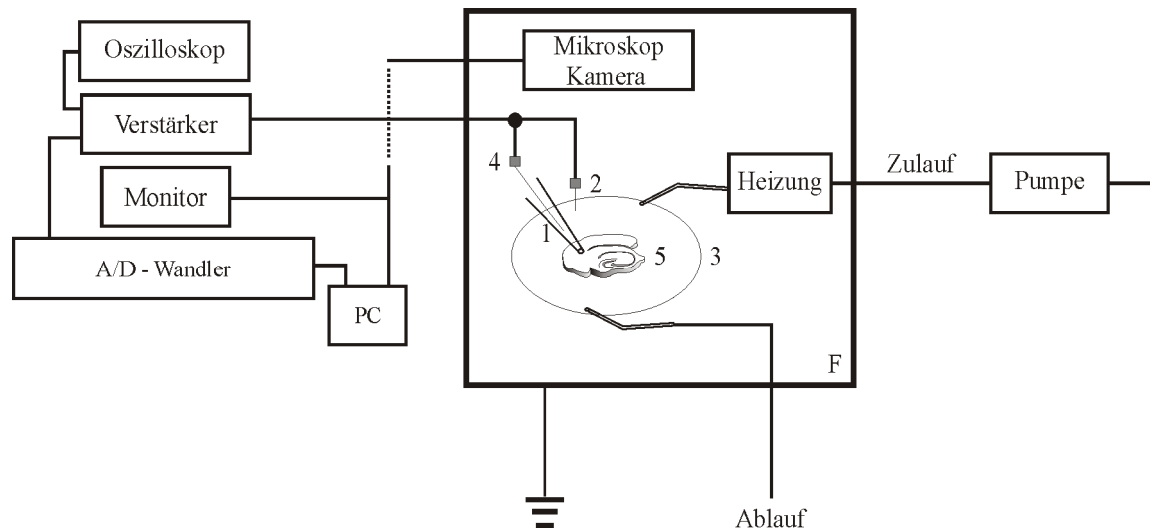


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für intrazelluläre Ableitungen. (1) Patch-Pipette mit Ag/AgCl-Draht, (2) Referenzelektrode, (3) Messkammer, (4) Vorverstärker, (5) Gehirnschnitt, (F) Faraday-Käfig.

Die Einstrahlung elektromagnetischer Störfelder konnte durch eine spezielle Antistatikfolie (Velostat, 3M, Deutschland), welche die gesamte Messapparatur umgab, weitgehend ausgeschaltet werden. Vibrationen wurden mithilfe eines schwingungsgedämpften Tisches kompensiert. Zusätzlich wurden sämtliche Kabel am Faraday-Käfig mittels Isolierband fixiert, um den Einfluss mechanischer Schwingungsquellen weiter zu verringern.

Zur Ableitung wurden die Gehirnschnitte in eine Messkammer transferiert und mit konstanter Perfusion (1.8-2.4 ml/min) mit ACSF umspült. Die Temperatur während der Ableitungen betrug 32-36 °C, wobei die Abweichung während eines Experimentes nicht mehr als ± 0.5 °C betrug. Sowohl die exzitatorische als auch die inhibitorische synaptische Transmission wurde wenn nötig durch Zugabe des NMDA-Rezeptor Antagonisten DL-APV (60 μ M), des AMPA/Kainat-Rezeptor Antagonisten DNQX (10 μ M) und des GABA_A-Rezeptor Antagonisten Gabazin (5 μ M) in die Perfusionslösung vollständig blockiert. Alle pharmakahaltigen Lösungen wurden kurz vor dem jeweiligen Experiment hergestellt.

Die elektrischen Ströme wurden mit einem *Patch-Clamp*-Verstärker (Multiclamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) registriert. Die Aufzeichnung der verstärkten und gefilterten (Besselfilter, 3 kHz) Signale geschah nach Digitalisierung (Digitalisierungsrate: 10-100 kHz) durch einen A/D-D/A-Wandler (Data 1322A Series Interface, Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) mithilfe eines *Personal Computers* (Software: PCLAMP Version 9, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Die schnellen und langsamen Komponenten der Pipettenkapazität wurden vor dem Herstellen der Ganzzellkonfiguration kompensiert. Zur Messung von Spannungsantworten auf Strominjektionen wurde vor jedem einzelnen

Messprotokoll der Brückenabgleich (*Bridge Balance*) durchgeführt. Auf eine Korrektur der Spannungswerte für das Diffusionspotential (*Liquid Junction Potential*, ~ -10 mV) wurde verzichtet.

2.4.1.1 Zellidentifikation und topographische Organisation

Die Zellen wurden entsprechend der Position des Zellkörpers, ihrer Morphologie und ihrer elektrischen Eigenschaften, wie Membranwiderstand, Initialhyperpolarisation (SAG-Potential), AP-Muster kategorisiert. Pyramidenzellen in der hippocampalen Formation waren einfach zu identifizieren, da es sich bei ihnen um Zellen mit relativ großem, charakteristisch geformten Soma im *Stratum pyramidale* des Hippokampus bzw. Schicht III/V des EC handelt. Sie lassen sich aufgrund ihrer Größe und dem auffälligen, kaliberstarken Primärdendriten eindeutig von anderen Zelltypen in dieser Region abgrenzen. Die Identifikation von Sternzellen der Schicht II im mEC basierte auf der Charakterisierung von Alonso und Klink (Klink & Alonso, 1993, 1997a). Im Vergleich zu Pyramidenzellen haben Sternzellen keinen einzelnen prominenten Primärdendriten. Sternzellen besitzen unregelmäßige polygonale Zellkörper mit einer variablen Anzahl (4-8) von Primärdendriten.

Ziel dieser Arbeit war es unter anderem, die intrinsischen Zelleigenschaften von Sternzellen im mEC in Abhängigkeit von der topographischen Position im Hirn zu untersuchen. Hierzu wurde zu jedem verwendeten Horizontalschnitt die entsprechende Position auf der dorso-ventralen Achse aufgezeichnet (Abb. 7). Als ventral wurden alle Schnitte zwischen 2 bis 4 mm Interaural (-8 bis -6 mm Bregma) zusammengefasst während alle Schnitte zwischen 4 bis 6 mm Interaural (-6 bis -4 mm Bregma) als dorsal betrachtet wurden. Die Definition basierte auf den Koordinaten von Paxinos und Watson (Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition*. New York, Elsevier, 2004).

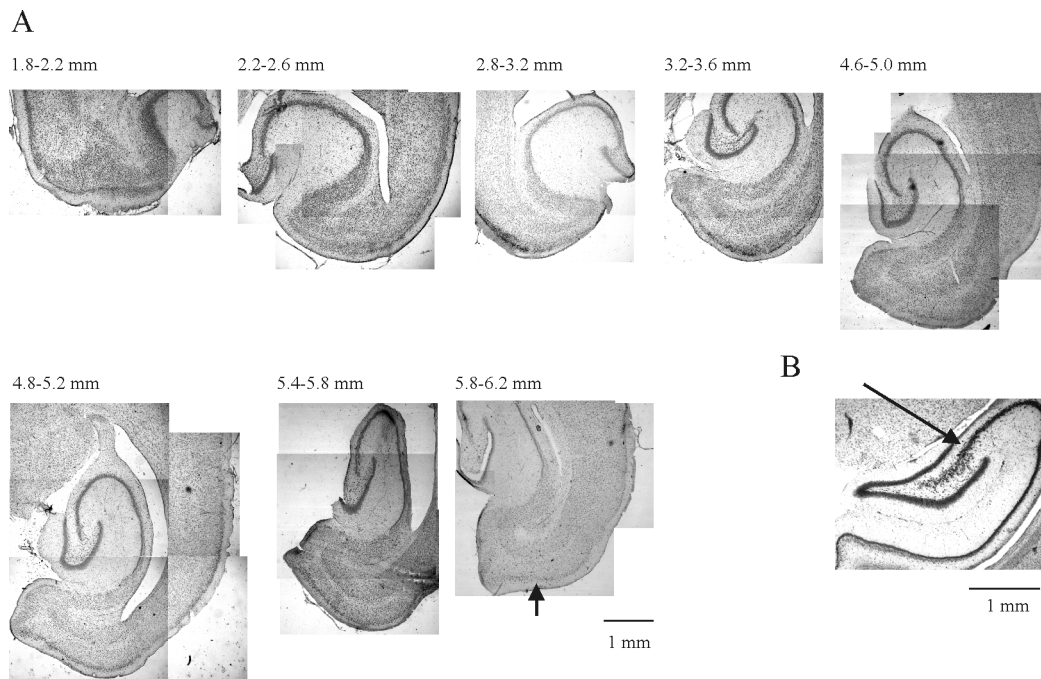


Abbildung 7: Fotografien horizontaler und koronarer Hirnschnitte (Kresylviolett-Färbung). A) Horizontale Hirnschnitte der hippocampalen Formation der Ratte entlang der dorso-ventralen Achse (Positionsangabe, Interaural [mm]). Der Pfeil weist auf den Ableitort für entorhinale Sternzellen hin. B) Hippokampaler koronarer Hirnschnitt mit markiertem Ableitort für die Registrierung von θ -Oszillationen.

2.4.1.2 Datenanalyse intrazellulärer Ableitungen

Die Messdaten aus Einzelleitungen wurden mit der Software Clampfit 9.0 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) analysiert. Die Membranzeitkonstante (τ = tau, ms) wurde aus der Spannungsantwort der Zelle auf eine 500 ms andauernde Strominjektion von -100 pA bestimmt. Die Membranzeitkonstante ergab sich aus der Anpassung einer monoexponentiellen Funktion an 80 % der abfallenden Spannungsflanke. Die Analyse des Membranwiderstandes (R_{input}), Serienwiderstandes, Ruhemembranpotentials (RMP), SAG-Ratio, AP-Latenz (*Spike Latency*) und AP-Musters sind in der Abbildung 8 verdeutlicht.

2. Material und Methoden

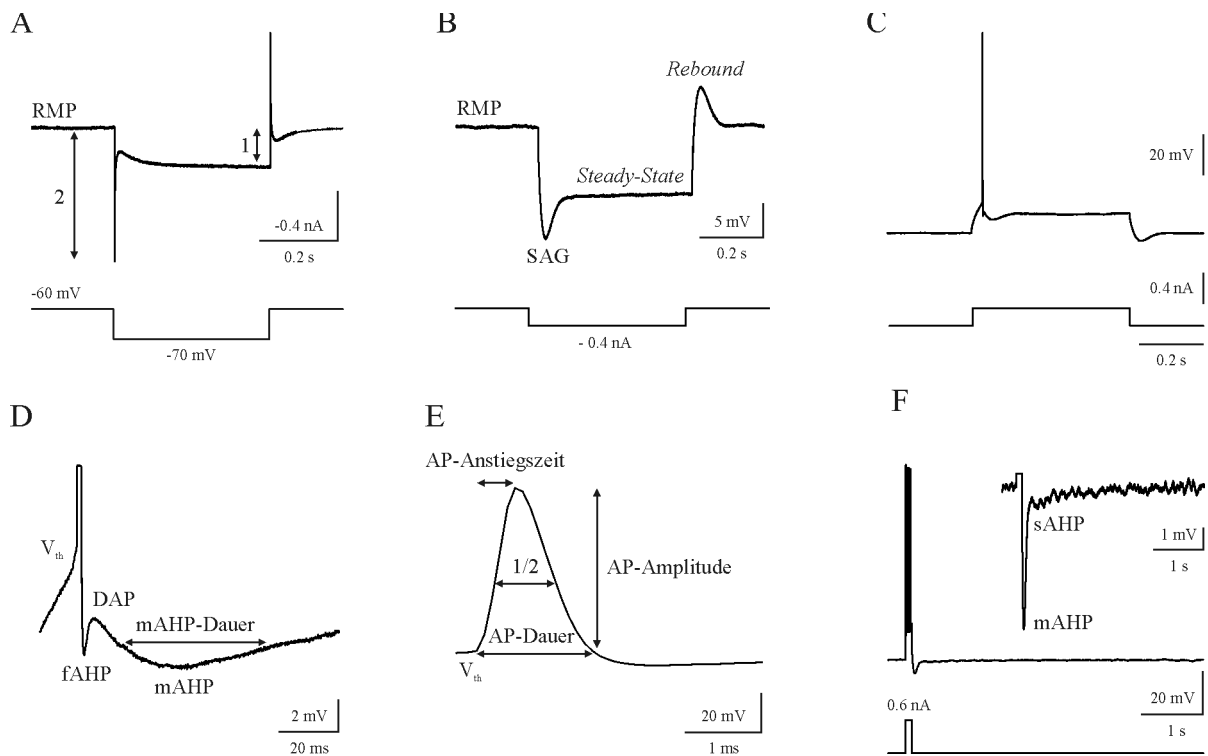


Abbildung 8: Analyse der intrinsischen Zelleigenschaften einer Sternzelle der Schicht II des mEC.

A) Spannungsklemm-Modus. Repräsentative Stromantwort auf einen Spannungsschritt von -60 auf -70 mV (Dauer 400 ms). 1 entspricht der Stromdifferenz zur Bestimmung des Membranwiderstandes. 2 entspricht der Stromdifferenz zur Bestimmung des Serienwiderstandes. B-F) Durch rechteckige Strominjektionen im Stromklemm-Modus vom RMP aus werden Depolarisation und Hyperpolarisation der Zellmembran mit charakteristischen Merkmalen wie Nachdepolarisation nach Beendigung einer hyperpolarisierenden Strominjektion (*Rebound*) mit und ohne Aktionspotential, ausgelöst. B) Charakteristische Hyperpolarisation nach Kommandostrom von -400 pA über 500 ms. C) Bei genügend starker Depolarisation werden in erregbaren Zellen Aktionspotentiale ausgelöst. D) Vergrößerte Darstellung des Aktionspotentials aus C mit biphasischer Nachhyperpolarisation (fAHP, ADP und mAHP). E) Vergrößerte Darstellung des monoton abfallenden Aktionspotentials aus D. F) Aus einem Kommandostrompuls von 600 pA und einer Dauer von 100 ms resultiert die für eine Sternzelle charakteristische Spannungsantwort (Puls muss Aktionspotential auslösen). Abkürzungen: DAP (Nachdepolarisation), fAHP (schnelle Nachhyperpolarisation), mAHP (mittlere Nachhyperpolarisation), sAHP (langsame Nachhyperpolarisation), AP (Aktionspotential), RMP (Ruhemembranpotential), SAG (durch Strominjektion ausgelöste Initialhyperpolarisation), *Steady State* (stationäre Spannungsantwort), V_{th} (Schwellenpotential)

Die Spitzenfrequenz der Membranpotentialoszillationen wurde mithilfe der Fourier-Transformation (*Fast Fourier Transform* = FFT, Größe 0.61 Hz, Hamming Fenster, 50 % Fensterüberschneidung) als auch mittels Autokorrelation bestimmt. Zur Analyse wurden 1-5 Sekunden (s) lange, aktionspotentialfreie Datenblöcke einer 5-30 s langen Strominjektion, welche die Zelle auf das Schwellenpotential depolarisierte, verwendet. Die Initialhyperpolarisation (SAG-Potential) wurde durch ansteigende hyperpolarisierende Strominjektionen (500 ms, 10 pA Schrittweite) ausgelöst. Eine derartige Strominjektion bewirkt eine starke Hyperpolarisation, welche von einem leichten Rückgang der Spannungsantwort

gefolgt wird, bevor sich ein weniger hyperpolarisiertes Gleichgewichtspotential einstellt (Alonso & Klink, 1993). Die Eigenschaften des SAG-Potentials wurden bei maximalen Strominjektionen von -400 als auch -200 pA ausgewertet. Unter dem Begriff *SAG-Ratio* versteht man den Quotienten aus den Differenzen von Gleichgewichtspotential und RMP und der maximalen Spannungsantwort und dem RMP. Die Zeitkonstante für den Übergang vom Spannungsmaximum zum Gleichgewichtspotential wurde durch Anpassung einer mono- oder biexponentiell abfallenden Funktion an den Spannungsverlauf bestimmt. Der anzupassende Bereich erstreckte sich, um Artefakte auszuschließen, vom Zeitpunkt der maximalen Spannungsantwort plus 7 ms bis zum Ende der Strominjektion. Ein biexponentieller Verlauf wurde angenommen, wenn sich die Zeitkonstanten um nicht mehr als Faktor 15 unterschieden (Giocomo et al., 2007). Die schnelle Zeitkonstante wurde angegeben.

Die Resonanzfrequenz einer Zelle wird aus der Spannungsantwort auf eine Wechselstrominjektion (Abb. 9) mit linear ansteigender Frequenz mit konstanter Amplitude ermittelt (Puil et al., 1986; Hutcheon & Yarom, 2000; Erchova et al., 2004). Diese Art der Strominjektion wird vielfach auch ZAP (Impedanz-Amplituden-Profil) genannt. Das Profil des ZAPs wurde vor der Messung aus der Formel $I(t) = I_0 (\sin 2\pi f(t) t)$ mit $f(t) = f_0 + (f_m - f_0) t / (2T)$ kalkuliert (f_0 : minimale Frequenz; f_m : maximale Frequenz; I_0 : Stromamplitude; t : Zeit; T : Dauer der Wechselstromstimulation). In dieser Arbeit wurden folgende Parameter verwendet: $f_0 = 0$ Hz, $f_m = 20$ Hz, $T = 30$ s. Die komplexe Impedanz (oder auch Wechselstromwiderstand) gibt das Amplitudenverhältnis von sinusförmiger Wechselspannung zu sinusförmigem Wechselstrom und die Phasenverschiebung zwischen diesen beiden Größen an. Die Stromamplitude wurde individuell angepasst, um eine Änderung der Membranspannung von mehr als 10 mV während der sinusförmigen Strominjektion zu vermeiden. Nach Mittelung von 5 Durchläufen ergibt sich aus dem Impedanzspektrum die mittlere Resonanzfrequenz.

2. Material und Methoden

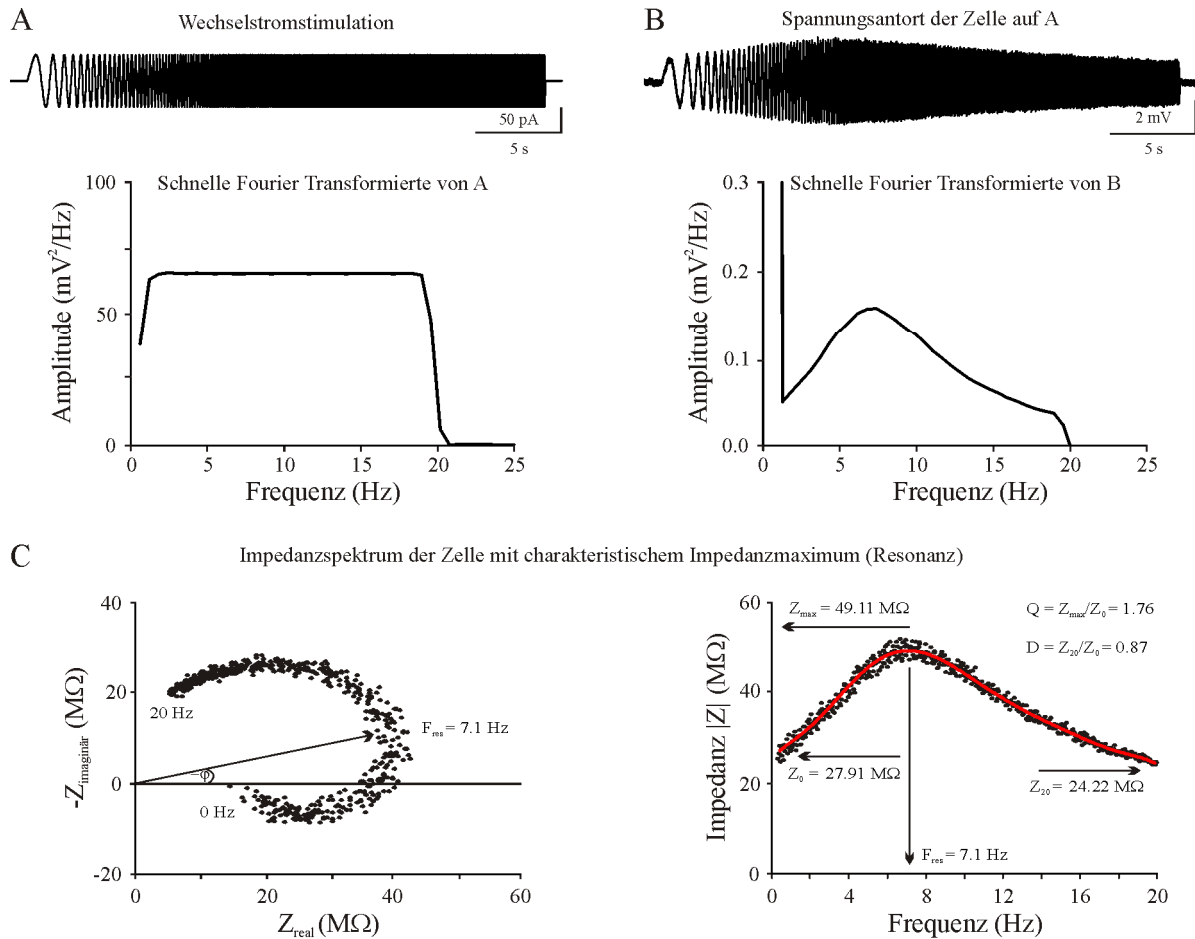


Abbildung 9: Analyse der Resonanzeigenschaften einer Sternzelle des mEC. A-B) Die sinusförmige Strominjektion und die Membranspannungsantwort der Zelle als Funktion der Zeit. Die resultierenden FFTs sind jeweils abgebildet. C) Das Impedanz-Locus Diagramm, bei dem der reale Teil (Z_{real}) gegen den negativ imaginären Teil ($-Z_{\text{imaginär}}$) aufgetragen wird, zeigt die Impedanz als Vektor an. Mithilfe des Impedanzprofils lässt sich die Resonanzbandbreite, die Resonanzfrequenz (F_{res}), der zugehörige Qualitätsfaktor (Q-Faktor) und die Tiefpasseigenschaften (D-Wert) bestimmen.

Um das Spektrum und die Kohärenz von MPOs zu untersuchen, wurden drei verschiedene, sich gegenseitig ergänzende Methoden verwendet. Es kamen die FFT, die *Wavelet*-Analyse und die Autokorrelation zum Einsatz (Abb. 10). Die MPO-Frequenz wurde definiert als die Frequenz zwischen 1-15 Hz mit der höchsten Spitzenstärke (auch Power genannt, *Peak Power*). Für die Analyse wurden mindestens 2 s lange Datenbereiche ohne APs verwendet. Es stellte sich heraus, dass sich hinsichtlich der MPO-Frequenz kaum Unterschiede zwischen den drei Methoden fanden. Das deutet darauf hin, dass MPOs hinreichend stationär hinsichtlich ihres Spektrums sind, um mithilfe der FFT und der Autokorrelation analysiert zu werden.

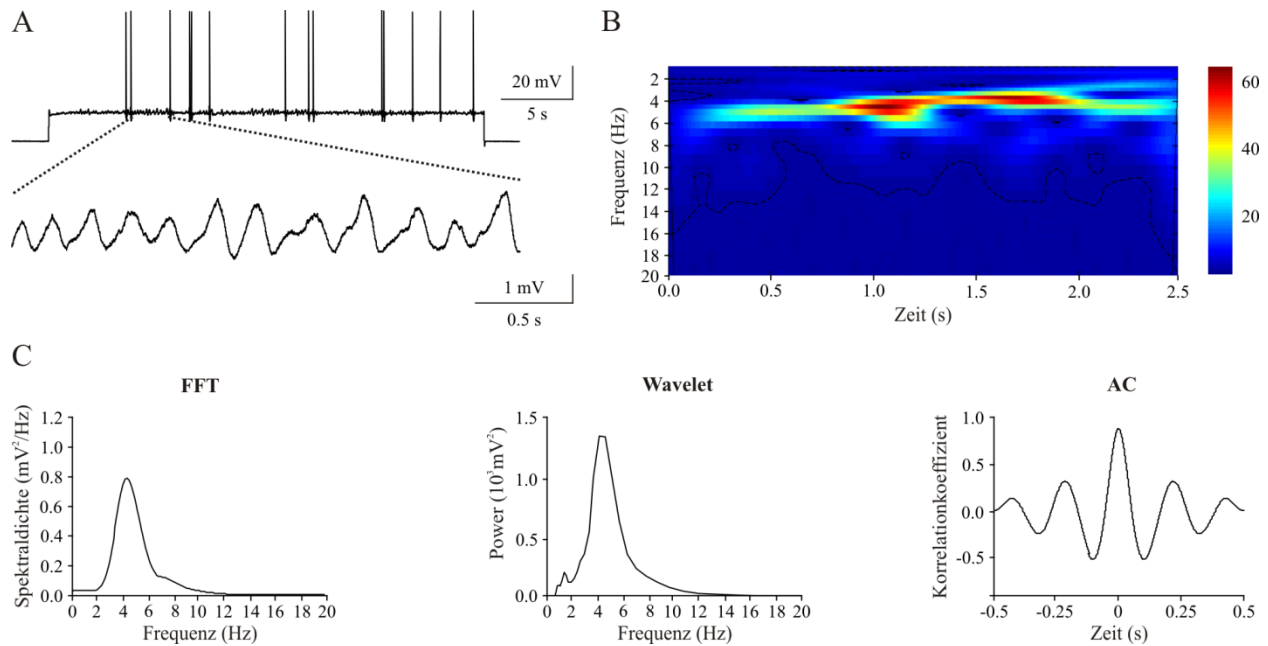


Abbildung 10: MPO-Analyse einer Sternzellen des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von MPOs bei Depolarisation. B) Zugehörige farbkodierte *Wavelet*-Analyse (Morlet). C) Analyse der in A gezeigten Aufnahme (2.5 s) mittels FFT (links), Wavelet (mittig) und Autokorrelation (AC, rechts). Alle 3 Methoden zeigen ein Frequenzmaximum von ~ 4 Hz.

2.4.1.3 Synaptische Übertragung

Die Registrierung postsynaptischer Ströme erfolgte in der Ganzzelleableitung von hippocampalen CA1 Pyramidenzellen. Dabei wurde zwischen exzitatorischen (EPSCs) und inhibitorischen (IPSCs), sowie zusätzlich zwischen spontanen (sEPSCs, sIPSCs) und Miniaturströmen (in der Abwesenheit von aktionspotentialabhängiger Neurotransmitterfreisetzung, mEPSCs, mIPSCs) unterschieden. Das Haltepotential während der Registrierung betrug generell -70 mV. Die Entstehung spontaner APs wurde durch die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Tetrodotoxin (TTX), das spezifisch spannungsabhängige Natriumkanäle blockiert, in einem Teil der Experimente verhindert. Zur pharmakologischen Isolierung der einzelnen synaptischen Stromkomponenten wurden durch die Zugabe spezifischer Pharmaka zu der extrazellulären Lösung unerwünschte Komponenten blockiert. Zur Isolierung der von GABA_A -Rezeptoren vermittelten, inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSCs) wurden AMPA/Kainat-Rezeptoren mit CNQX ($10 \mu\text{M}$) blockiert. Zur Registrierung von AMPA/Kainat-Rezeptoren vermittelten, exzitatorischen postsynaptischen Ströme wurde der GABA_A -Rezeptorantagonist Bicucullin ($10 \mu\text{M}$) verwendet. Eine NMDA-Rezeptorkomponente der registrierten Ströme kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da NMDA-Rezeptoren bei einer Konzentration von 1.8 mM MgSO_4 in der extrazellulären Lösung und einem Haltepotential von -70 mV weitestgehend blockiert sind. Die Analyse der Amplituden und Frequenzen postsynaptischer Ströme erfolgte durch Verwendung des Programms Clampfit 9.0.

2.4.2 Feldpotentialableitung

Hippokampale extrazelluläre Feldpotentiale wurden in der Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*) der Regionen CA1 und CA3 abgeleitet (Abb. 11). Referenzelektroden wurden hierfür fest in die Interfacekammer eingebaut. Sie bestehen aus unter großem Druck zu Pellets gepresstem Silber und Silberchlorid im Verhältnis 30:70 und sind über einen Silberdraht mit dem Vorverstärker verbunden. Die Ableitelektroden sind Mikroelektroden mit einem Spitzendurchmesser von 1-3 μm . Sie wurden aus Borosilikat-Glasskapillaren (Science Product GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Elektrodenausziehgerät P-87 (Sutter Instruments, Novato, USA) hergestellt, mit ACSF gefüllt und mit einem chloriertem Silberdraht versehen, welcher luftdicht mit einem Hartklebewachs (Deiberit 502, Goslar, Deutschland) abgedichtet wurde. Der Widerstand der verwendeten Ableitelektroden betrug 4-8 M Ω . Zur Reizgenerierung wurden bipolare Reizelektroden verwendet. Eine Glaskapillare aus Borosilikatglas mit eingezogener Trennwand – ein sogenanntes Thetaglas (Science Product GmbH, Hofheim, Deutschland), mit einem ovalen Durchmesser von 2 x 2.5 Millimeter (mm) und einer Wandstärke von 0.2 mm, wurde an einem vertikalen Elektrodenziehgerät (aus hauseigenen Werkstätten) mit definierter Zugkraft und Geschwindigkeit ausgezogen (Spitzendurchmesser von ca. 0.1 mm). In die Kapillarlumina wurden mit 0.2 mm starken Silberdrähten verlötete 0.05 mm starke Platindrähte eingeführt. Die Platindrähte wurden durch die Kapillarspitze geführt und so, mit durch Hitze verflüssigtem Schellack verschweißt, dass sie parallel zueinander auf ca. 0.1 mm Abstand fixiert waren. Zuletzt wurden die Silberdrähte auf ca. 1-2 mm gekürzt und das Ende des Thetaglases mit Hartklebewachs verschlossen.

Zur Qualitätsüberprüfung der einzelnen Gehirnschnitte wurden die Schaffer-Kollateralen mit einem Doppelpuls (100 μs Dauer, 50 ms Interstimulusintervall) mit 75 % des Stromes stimuliert, der eine maximale Antwort ergab. Die Spannungsantwort in der Pyramidenzellschicht (EPSP und Populationsspike) spiegelt die synchronisierte Erregung und Entladung von mehreren hundert Nervenzellen wider. Die aus Plexiglas bestehenden Messkammer (Abb. 11) kann in zwei Perfusions- und eine Heizkammer unterteilt werden. Die Perfusionskammer (25 x 55 mm große Vertiefung) wurde mit einem speziellen Linsenfilterpapier (Kodak, Stuttgart, Deutschland) ausgelegt, auf dem die Schnitte gelagert werden konnten, um eine möglichst große Diffusionsfläche zu bieten. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug ca. 1.8 ± 0.2 ml/min und wurde mithilfe einer Rollenpumpe (Abimed, Langenfeld, Deutschland) erreicht. Die Heizkammer ist mit Bidest. gefüllt, erwärmt die zugeführte Lösung und leitet Carbogen an die Oberfläche der Hirnschnitte. Unter diesen Bedingungen blieben die Hirnschnitte ~ 14 Stunden (h) nach der Präparation vital.

2. Material und Methoden

Die Messsignale wurden mit einem Verstärker (hausinternes Modell) vorverstärkt und gefiltert (1 kHz, Tiefpass), bevor diese mit einer Abtastrate von 5 kHz digitalisiert (CED 1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK), und mithilfe der Software Spike2 3.21 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK) gespeichert und analysiert wurden.

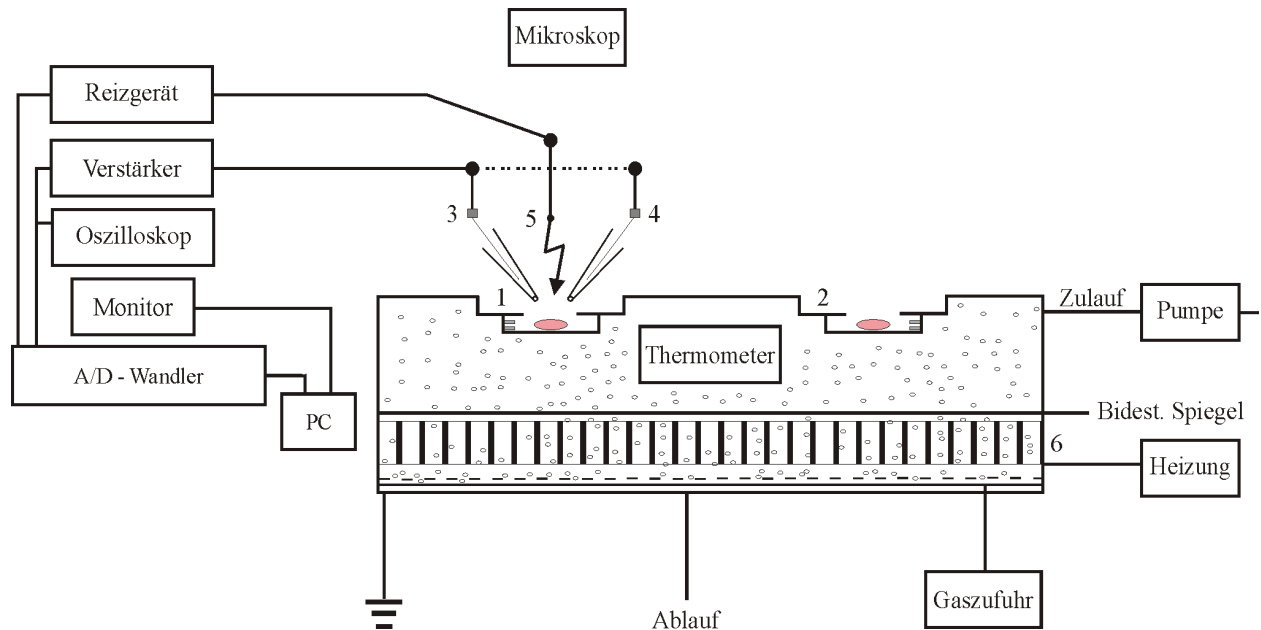


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für extrazelluläre Ableitungen. (1-2) Messkammer mit Gewebeschnitt und Referenzelektroden, (3-4) Vorverstärker und Ableitelektrode mit Ag/AgCl-Draht, (5) Reizelektrode, (6) Heizfolie

2.4.2.1 Datenanalyse extrazellulärer Ableitungen

Nach Stabilisierung der pharmakologisch induzierten Netzwerkoszillationen wurden diese insbesondere auf die Power, Halbbandbreite (*Half-Bandwidth*) und Spitzenfrequenz (*Peak Frequency*) untersucht (Abb. 12). Dazu wurden 100 s lange Datenabschnitte direkt vor und nach der 60-minütigen Applikation der zu untersuchenden Substanz zur Analyse ausgewählt. Die spektrale Leistungsdichte gibt die Leistung beziehungsweise die Power eines Signals in einem kleinen Frequenzband an. Über die Frequenz aufgetragen spricht man vom Leistungsdichtespektrum. Für die Spektralanalyse wurde mithilfe der FFT (Größe 1.221 Hz, Hanning Fenster) mit der Software Spike2 das Power-Spektrum der jeweiligen Datenblöcke berechnet (Abb. 12A). Die Frequenz und die Halbbandbreite wurden nicht angegeben, wenn die Stärke der Oszillationen unter 10 % der des Kontrollniveaus lag. Die Analyse des Zeitverlaufs während der gesamten pharmakologischen Applikation wurde für jedes aufeinanderfolgende 90 s lange Datenstück durchgeführt. Die transiente Erhöhung der Spitzenstärke wurde als ein Anstieg der Oszillationsstärke von mehr als 20 % gegenüber dem Kontrollniveau innerhalb eines

2. Material und Methoden

Zeitfensters von 10-40 min nach Applikation definiert. Um einen Vergleich der einzelnen erhobenen Messdaten zu ermöglichen, wurden die Spitzenstärke und die Halbbandbreite auf die Kontrollwerte normalisiert. Zur Bestimmung der Latenz, resultierend aus der Fortleitung der Oszillation von der CA3 Region zu der CA1 Region, wurde mittels Kreuzkorrelationsanalyse von 100 s Datenbereichen beider Regionen durchgeführt. Die Stärke der oszillatorischen Kopplung zwischen der Regionen CA3 und CA1 wurde mithilfe des durchschnittlichen Korrelationskoeffizienten bestimmt. Weiterhin wurde für Kainat-induzierte Oszillationen die Oszillationsamplitude als die mittlere Spannungsdifferenz von Spitze zu Spitze (*Peak to Peak Amplitude*) von 10 aufeinanderfolgenden Zyklen quantifiziert.

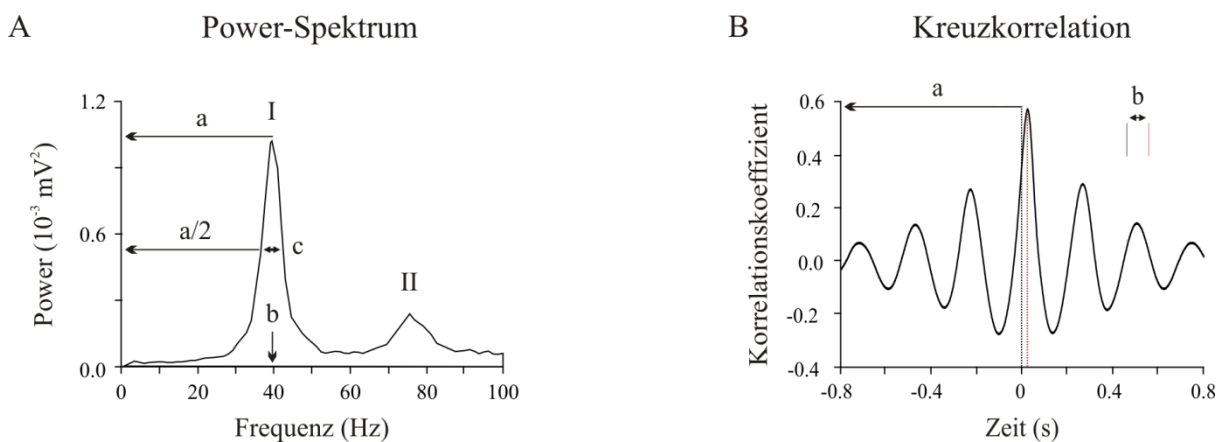


Abbildung 12: Analyse der hippocampalen Netzwerkoszillationen. A) Das Power Spektrum über ein 100 s langes Datenstück liefert die Oszillationsfrequenz (b) und die Oszillationsstärke (a). Darüber hinaus kann ausgehend von der Oszillationsstärke die Halbbandbreite (c) bestimmt werden. B) Mithilfe der Kreuzkorrelation kann die Latenz zwischen zwei Ableitorten - hier der CA3 Region und der CA1 Region - bestimmt werden, wobei der Korrelationskoeffizient Auskunft über die Synchronität gibt.

2.5 Statistiken

Numerische Daten sind als arithmetische Mittel \pm Standardfehler angegeben. Für die Anzahl der in eine Statistik eingehenden Neurone wurde die Variable „n“ verwendet. Regressionslinien wurden mithilfe der *Statistic Tollbox (aoctool)* von Matlab R2006 (The MathWorks, Aachen, Deutschland) erstellt und die resultierenden r-Werte sind angegeben. Histogramme und Beschreibungen der Datenverteilung wurden mithilfe der *Statistic Toolbox (dfittool)* kalkuliert. Für statistische Vergleiche wurde je nach Art der zugrundeliegenden Daten der gepaarte oder ungepaarte Student's t-Test (Origin 6.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) verwendet. Signifikanzniveaus sind in Diagrammen mit * für $p < 0.05$, ** für $p < 0.01$ und *** für $p < 0.001$ gekennzeichnet. Die Zusammenstellung, sowie graphische Bearbeitung der Diagramme und Graphiken, erfolgte unter Verwendung der Software CorelDraw 13 (Corel, Unterschleißheim, Deutschland).

2.6 HISTOLOGIE VON HIRNSCHNITTEN

2.6.1 Biocytin Färbung

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen mit konventionellen Glasmikroelektroden wurde während einiger elektrophysiologischer Ableitungen 0.5 % Biocytin in die jeweilige Zelle injiziert. Die 400 µm dicken Gehirnschnitte wurden anschließend in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur Färbung bei 4 °C gelagert (maximal 3 Monate). Die Injektion von Biocytin ermöglicht es, morphologische Informationen über die Zellen zu erhalten.

2.6.1.1 Diaminobenzidin

Die Dünnschnittpräparate (75 µm Dicke) wurden mit Avidin-Biotin-Reagenz (ABC-Kit) und Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubiert und anschließend durch Zugabe von Osmiumoxyd (OsO₄) intensiviert (Details siehe Gloveli et al., 1997a). Um Gehirnschnitte mithilfe des Gefriermikrotoms in 80 µm dicke Schnitte zu schneiden, wurden sie für 24 h in einer 30 % Zuckerlösung (in 0.1 % Phosphatpuffer (PB)) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie 2-mal für jeweils 10 min mit 0.1 M PB gewaschen, in 30 % H₂O₂ für 30 min inkubiert und danach 3-mal für je 10 min mit einer 0.1 M Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Die gereinigten Gehirnschnitte wurden mit einer Lösung bestehend aus 0.2 g bovinem Serumalbumin (BSA), 50 µl Triton X-100, 9.8 ml 0.1 M PBS permeabilisiert und in Avidin-Biotin-Reagenz (ABC-Kit) für 24 h auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen (2-mal mit PBS, 2-mal mit 0.1 M PB für jeweils 15 min) wurden die Schnitte zuerst für 45 min in filtrierter Diaminobenzidin-(DAB)-Lösung (0.02 g + 50 ml Bidest. + 50 ml 0.2 M PB) und anschließend für 10-15 min in 0.006 % DAB-H₂O₂ inkubiert. Nach einem erneuten Waschgang (3-mal mit 0.1 M PB für jeweils 10 min) wurden die Schnitte mit Zuhilfenahme eines Pinsels aus der Platte genommen und solange in eine 0.5 % Osmium-Lösung in 0.1 M PB (0.5 ml OsO₄ + 0.5 ml Bidest. + 1 ml 0.2 M PB) getaucht bis eine gleichmäßige hellbraune Färbung zu sehen war. Anschließend wurden die Schnitte gewaschen (3-mal mit 0.1 M PB für jeweils 10 min) und auf Objektträger aufgezogen. Folgende Alkoholreihe wurde für jeweils 3 min durchgeführt: 70 %, 90 %, 100 %, absoluten Ethanol, 50 % Ethanol + 50 % Xylol, 100 % Xylol (zum Entfetten). Die Schnitte wurden mit dem Einschlussmittel DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt.

2.6.1.2 Streptavidin-Cy3

Die Hirnschnittpräparate wurden für 24 h in eine 30 %ige Zuckerlösung (in 0.1 % PB) gebracht und inkubiert, um sie am Gefriermikrotom (Leitz; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 100 µm dicke Schnitte zu schneiden. Anschließend wurden die Dünnschnittpräparate 3-mal für

jeweils 10-15 min mit 0.1 M Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen und die Membran durchlässig für den verwendeten Farbstoff zu machen wurden die Dünnschnittpräparate für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % normalem Ziegen Serum (NGS, Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 2 % Triton X-100 in 0.1 M PBS behandelt. Danach wurden die Dünnschnittpräparate mit 0.5 % Triton X-100, 2 % NGS und 0.5 % Streptavidin-Cy3 (Sigma, Steinheim, Deutschland) bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nach 24 h wurden die Hirnschnittpräparate 3-mal für jeweils 10-15 min mit 0.1 M PBS gewaschen und auf Objektträger aufgezogen, mit einem Einschlussmittel Polyvinylalkohol (Fluka, Steinheim, Deutschland) eingebettet und bei 4 °C horizontal und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.6.2 Andere Färbungen

2.6.2.1 Dextranamine

Mithilfe des Farbstoffes Tetramethylrhodamin (rhodamine, fluoro-ruby®; Molecular Probes, Europe BV, Leiden, Holland), mit einem Molekulargewicht von 3000 Da, wurden die Projektionszellen im *Stratum radiatum* in der CA1 Region und Faserverbindungen untersucht. Dextranamine werden sowohl anterograd als auch retrograd transportiert und ermöglichen Zellen und Faserverbindungen vollständig darzustellen. Um die Aufnahme des kristallinen Farbstoffes zu gewährleisten, werden im Bereich der Farbstoffapplikation kleine Läsionen gesetzt. Nach Verlust der funktionellen Integrität der Fasern geben diese den aufgenommen Farbstoff wieder ab, so dass mit diesem Verfahren nur lebende Faserverbindungen markiert werden können. Der Farbstoff wird mithilfe einer Nadel (Durchmesser 0.15 mm) oder einer 27-gauge Kanüle unter visueller Kontrolle in die zu untersuchende Gehirnregion appliziert. Die Farbstoffapplikation erfolgte in die innere Molekularschicht oder Körnerzellschicht des DG. Die Hirnschnittpräparate wurden für 4-6 h in einer Phasengrenzflächen-Kammer mit begaster ACSF gelagert. Sie wurden sofort oder nach elektrophysiologischer Ableitung in 4 % PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Hirnschnittpräparate in 30-prozentiger Zuckerlösung für mindestens 6 h inkubiert, um sie anschließend in 50 µm dicke Schnitte, mithilfe eines Gefriermikrotoms (Leitz; Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), zu schneiden. Anschließend wurden die Dünnschnittpräparate auf Objektträger aufgezogen (SUPER FROST Plus; Menzel, Braunschweig, Deutschland), in dem Einschlussmittel Polyvinylalkohol (Fluka, Steinheim, Deutschland) eingebettet und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

2.6.2.2 Kresylviolett-Färbung

PFA-fixierte Hirnschnittpräparate wurden für 24 h in einer 30-prozentigen Zuckerlösung inkubiert und bei 4 °C aufbewahrt. Mithilfe eines Gefriermikrotoms (Leitz, Leica Microsystem, Wetzlar, Deutschland) wurden die behandelten Hirnschnittpräparate 30 µm dünn geschnitten. Diese Dünnschnittpräparate wurden auf mit Glucose beschichtete Objektträger gelegt und zur Entwässerung in folgende Alkoholreihe für je 3 min gebracht: 96 %, 90 %, 70 %, 50 %, 30 % und mit Bidest. gereinigt. Anschließend wurden die Dünnschnittpräparate für 1.5 min in 0.5%ige Kresylviolett-Lösung und vor der Farbstoffdifferenzierung kurz in Bidest., zur Entfernung von überschüssigem Farbstoff, gewaschen. Die Differenzierungslösung bestand aus 50-prozentigem Ethanol und 150 µl Essigsäure in einem Gesamtvolumen von 200 ml. Die Dünnschnittpräparate durchliefen eine weitere Alkoholreihe (für jeweils 3 min) von 70 %, 90 %, 96 %, absolutem Ethanol, 2-mal 2-Isopropanol, 2-mal Xylol (zum Entfetten), bevor sie mit dem Einschlussmittel DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt wurden.

3. ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG VON STERNZELLEN DER SCHICHT II DES MEC

Die topographische Organisation von Rasterzellen ist ein besonderes Merkmal des mEC (Fyhn et al., 2004; Hafting et al., 2005). Sie sind an der Kodierung von Positionen unabhängig von der Umgebung beteiligt und liegen in der Schicht II des mEC (Sargolini et al., 2006; Welinder et al., 2008). Sternzellen sind der häufigste Zelltyp in dieser Schicht. Sie sind unter anderem mit MPOs und Resonanz im θ -Bereich ausgestattet. Über die Abhängigkeit dieser essenziellen Zelleigenschaften von Position, Alter und zugrundeliegenden Leitfähigkeiten ist wenig bekannt. Es sollten zunächst Sternzellen der Schicht II des mEC charakterisiert werden. Dazu wurden Messungen von insgesamt 179 Sternzellen in juvenilen und adulten Hirnschnitten der Ratte mithilfe der *Patch-Clamp*-Technik in der Ganzzellkonfiguration durchgeführt. Die Abhängigkeit unterschiedlicher Zelleigenschaften von der dorso-ventralen Position und vom Alter, sowie deren pharmakologische Modulationen, sind untersucht worden. Alle analysierten Sternzellen hatten ein Ruhemembranpotential < -52 mV, sowie einen Membranwiderstand > 20 M Ω . In einer Untergruppe der Zellen wurde überprüft, ob elektrophysiologisch indentifizierte Sternzellen auch die typische Morphologie von Sternzellen nach Klink & Alonso (1997a) zeigen (Abb. 13). Eine Übersicht über alle untersuchten elektrophysiologischen Eigenschaften von Sternzellen im mEC ist in Tabelle 1 zu finden.

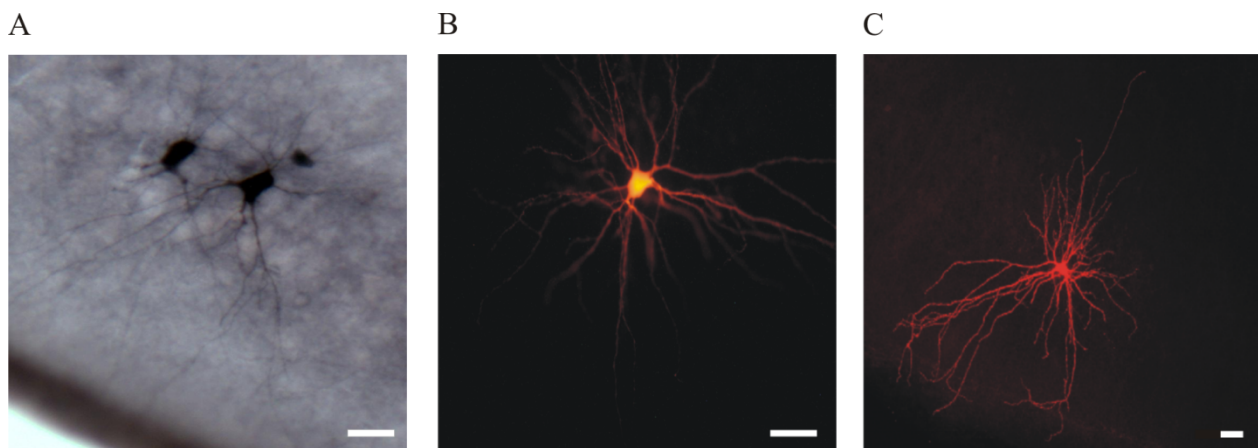


Abbildung 13: Morphologie von Sternzellen des mEC. Zellen wurden mit Biocytin gefüllt, mit DAB-Färbung (A) oder Streptavidin-Cy3 (B, C) sichtbar gemacht und mit einem Fluoreszenzmikroskop (C: konfokal) visualisiert. In den gezeigten Beispielen wird die typische Morphologie einer Sternzelle mit einer großen Anzahl von sich schnell verzweigenden Stammendriten deutlich. Der Skalierungsbalken entspricht 20 μ m.

3. Ergebnisse

Zelleigenschaft	Wert \pm SEM (n)	Zelleigenschaft	Wert \pm SEM (n)
R_{input} (M Ω)	55.5 ± 1.5 (131)	Resonanz bei Depo	
RMP (mV)	-59.5 ± 0.2 (131)	Frequenz (Hz)	3.7 ± 0.1 (101)
Tau (ms)	11.8 ± 0.3 (130)	Q-Faktor	1.27 ± 0.02 (101)
Schwellenpotential (mV)	-41.6 ± 0.3 (131)	Bandbreite (Hz)	6.2 ± 0.2 (49)
Rheobase (pA)	168.8 ± 6.8 (131)	Z_0 (M Ω)	88.4 ± 3.6 (49)
SAG-Tau (ms)	24.5 ± 0.6 (127)	Z_{20} (M Ω)	30.8 ± 1.0 (49)
SAG-Ratio	0.69 ± 0.01 (128)	D-Wert	0.37 ± 0.01 (49)
AP-Latenz (ms)	78.5 ± 5.3 (131)		
AP-Amplitude (mV)	75.65 ± 0.9 (57)	Resonanz am RMP	
AP-Anstiegszeit (ms)	0.62 ± 0.01 (57)	Frequenz (Hz)	5.6 ± 0.1 (127)
AP-Maximum (mV)	33.5 ± 0.8 (57)	Q-Faktor	1.41 ± 0.01 (127)
AP-Dauer (ms)	1.74 ± 0.03 (57)	Bandbreite (Hz)	10.6 ± 0.3 (52)
AP-Halbbreite (ms)	0.80 ± 0.01 (57)	Z_0 (M Ω)	53.6 ± 2.0 (52)
		Z_{20} (M Ω)	32.2 ± 0.9 (52)
AP-Anzahl (100 pA)	0.6 ± 0.1 (131)	D-Wert	0.63 ± 0.02 (52)
AP-Anzahl (200 pA)	3.8 ± 0.3 (131)		
AP-Anzahl (300 pA)	7.7 ± 0.4 (128)	Resonanz bei Hyper	
AP-Anzahl (400 pA)	11.2 ± 0.4 (127)	Frequenz (Hz)	7.3 ± 0.2 (111)
		Q-Faktor	1.58 ± 0.02 (111)
fAHP-Amplitude (mV)	-7.1 ± 0.2 (129)	Bandbreite (Hz)	18.1 ± 0.4 (52)
DAP-Amplitude (mV)	1.4 ± 0.1 (129)	Z_0 (M Ω)	33.4 ± 1.5 (52)
mAHP-Amplitude V_{th} (mV)	-9.2 ± 0.1 (131)	Z_{20} (M Ω)	32.5 ± 1.1 (52)
mAHP-Amplitude DAP (mV)	-3.5 ± 0.1 (129)	D-Wert	1.00 ± 0.02 (52)
mAHP-Halbbreite (ms)	76.2 ± 3.4 (123)		
sAHP-Amplitude RAMP (mV)	1.3 ± 0.1 (123)	MPO-Frequenz (Hz)	3.6 ± 0.1 (85)

Tabelle 1: Zusammenfassung der wesentlichen Eigenschaften von adulten Sternzellen des mEC. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. Abkürzungen: AP (Aktionspotential), mAHP (mittlere Nachhyperpolarisation), DAP (Nachdepolarisation), Depo (Depolarisation), Hyper (Hyperpolarisation), RMP (Ruhemembranpotential), V_{th} (Schwellenpotential), Z_0 (Impedanz bei 0 Hz), Z_{20} (Impedanz bei 20 Hz). Für die Analyse der Aktionspotentiale wurden nur Aufnahmen mit einem Serienwiderstand ≤ 15 M Ω verwendet.

3.2 EIGENSCHAFTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON POSITION UND ALTER

Viele Ionenkanäle, auch die für Resonanz und MPOs vermutlich verantwortlichen Kanäle, zeigen eine altersabhängige Expression in der hippocampalen Formation (Surges et al., 2006; Burton et al., 2008). Es ist also zu vermuten, dass Sternzeleigenschaften nicht nur von der Position sondern auch vom Entwicklungsstadium abhängen. Um dies zu untersuchen wurden die Eigenschaften von Sternzellen der Schicht II des mEC in juvenilen (20.8 ± 0.4 Tage; $n = 48$) und adulten (46.4 ± 0.7 Tage; $n = 79$) Ratten bestimmt (Serienwiderstand: $20.7 \pm 0.5 \text{ M}\Omega$; $n = 127$). Die erhaltenen Daten wurden auf Alters- und Positionsabhängigkeiten überprüft. Es zeigte sich, dass der dorso-ventrale Gradient wichtiger Eigenschaften bereits in juvenilen Ratten nachweisbar ist und sich in der weiteren postnatalen Entwicklung voll ausbildet (Abb. 14).

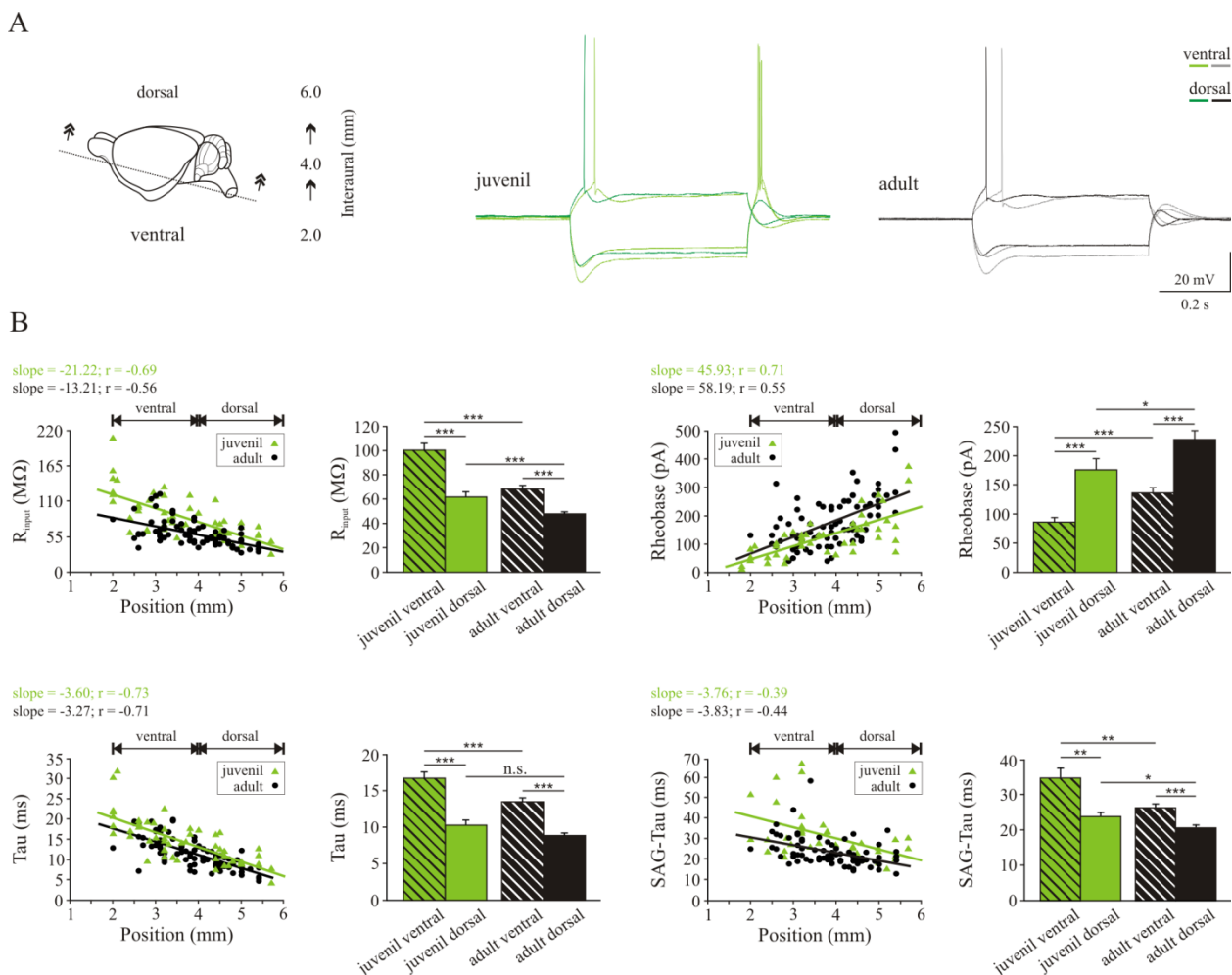


Abbildung 14: Analyse intrinsischer Eigenschaften von Sternzellen in Schicht II des mEC. A) Die schematische Zeichnung zeigt die anatomische Position (dorso-ventral) der horizontalen Hirnschnitte (links). Repräsentative Aufnahmen von Spannungsantworten auf -400 pA bis zum Schwellenpotential (10 pA Schritte; 500 ms) von juvenilen und adulten Ratten in Abhängigkeit ihrer dorso-ventralen Position (ventral: 2-4 mm Interaural; dorsal: 4-6 mm Interaural). B) Der Membranwiderstand (R_{input}), die Membranzeitkonstante (Tau), die Zeitkonstante des SAG-Potentials und die Stromschwelle zur Auslösung eines APs sind jeweils individuell für jede Sternzelle in Abhängigkeit von ihrer Position, und gemittelt für die einzelnen Gruppen, dargestellt. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; n.s.: nicht signifikant).

Der Membranwiderstand nahm sowohl entlang der dorso-ventralen Achse als auch mit dem Alter ab. Erwartungsgemäß stieg die Rheobase an. Unter Rheobase versteht man den kleinsten Strom mit unbestimmter Dauer, welcher in einer Zelle zur Auslösung eines APs benötigt wird, was als Stromschwelle angesehen werden kann. Ähnliche Zusammenhänge konnten weder für RMP noch für das AP-Schwellenpotential hergestellt werden. Es ist interessant, dass auch die Membranzeitkonstante mit zunehmendem Alter abnahm und eine Positionsabhängigkeit zeigte. Die Zeitkonstante des SAG-Potentials, welches durch hyperpolarisations-aktivierte Ionenkanäle verursacht wird, zeigte die gleichen Beziehungen und war in adulten dorsalen Sternzellen am kleinsten. Eine zusammenfassende, tabellarische Zusammenstellung aller Parameter findet sich am Ende des Kapitels (Tab. 2).

3.2.1 Die Latenz von APs

Ein weiterer wichtiger neuronaler Parameter ist die AP-Latenz. Sie beschreibt die Zeit vom Beginn eines Reizes bis zur Auslösung des ersten APs. Bei veränderter Erregbarkeit, in Abhängigkeit von Alter und Position, könnte man eine ebenso veränderte Latenz erwarten (Abb. 15). Eine signifikante Positionsabhängigkeit der mittleren Latenz zeigte sich nur in adulten ($r = 0.41$; $p < 0.001$) aber aufgrund der hohen Streuung nicht in juvenilen Sternstellen.

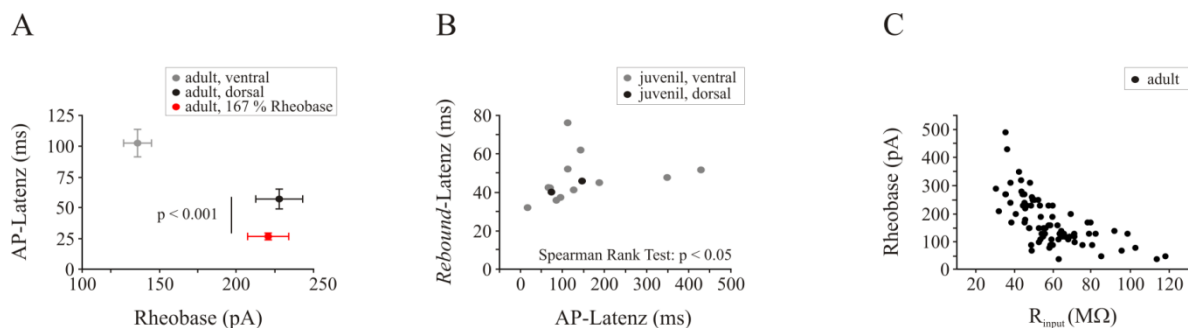


Abbildung 15: AP-Latenz von adulten Sternzellen in Schicht II des mEC. A) Die Latenz bis zur Auslösung des ersten AP adulter Sternzellen wird positionsabhängig moduliert. B) Die Latenz von *Rebound*-APs juveniler Sternzellen korreliert mit der initialen AP-Latenz. C) Die Rheobase sinkt mit steigendem Membranwiderstand in individuellen Sternzellen des adulten mEC ($n = 78$, *Spearman Rank Test*: $p < 0.001$).

Da die Rheobase dorsal 67 % höher war, könnte die Latenzveränderung hierauf zurückzuführen sein. Es zeigte sich aber, dass die Injektion von 67 % mehr Strom in ventralen Zellen die Latenzunterschiede zwischen dorsalen und ventralen Zellen mehr als kompensiert (Abb. 15A) und demzufolge die Rheobase im Wesentlichen die Latenz bestimmt. Die genaue Interpretation wird dadurch erschwert, dass sich auch die SAG-Kinetik ändert und das erste AP meist auf dem positiven SAG-Potential sitzt. Wenn die Latenz auch durch das SAG-Potential bestimmt wird, so

sollte die *Rebound*-Latenz mit der Latenz korrelieren. Die Latenz von *Rebound*-APs von juvenilen Sternzellen korrelierte mit der initialen AP-Latenz (Abb. 15B). Jedoch konnte nur in 13 von 33 ventralen und in 2 von 19 dorsalen Sternzellen ein AP auf dem *Rebound* ausgelöst werden. In adulten Tieren reichte eine Strominjektion von -400 pA in der Regel nicht aus, um ein AP in dorsalen Sternzellen auf dem *Rebound* auszulösen (ventral: 4 von 45 Zellen; dorsal: 0 von 34 Zellen). Um zu überprüfen, ob die beobachtete Positionsabhängigkeit von Latenz und Rheobase durch den Membranwiderstand der Zellen zu erklären ist, wurde die Rheobase mit dem Membranwiderstand der Zellen in Beziehung gesetzt (Abb. 15C). In der Tat fand sich ein solcher Zusammenhang. Das bedeutet, dass die anatomische Positionsabhängigkeit des Membranwiderstands sowohl die Positionsabhängigkeit der Rheobase als auch der Latenz und damit die Präzision des Entladungsverhaltens bedingt – ein Zusammenhang der sich im Laufe der Entwicklung quantitativ verändert.

3.2.2 Die Resonanzfrequenz in Abhängigkeit von der dorso-ventralen Position und dem Alter

Um eine mögliche Abhängigkeit des intrinsischen Resonanzverhaltens von der anatomischen Position der einzelnen Sternzellen und/oder dem Alter der Ratte festzustellen, wurde ein sinusförmiger Strom mit konstanter Amplitude und linear ansteigender Frequenz (0-20 Hz), der allgemein als ZAP (Impedanz-Amplitudenprofil) -Strom bekannt ist, injiziert (siehe Material und Methoden, Abb. 9). Dieser ZAP-Strom wurde an drei unterschiedlichen Membranpotentialen injiziert, um einen ersten Eindruck über spannungsabhängige Leitfähigkeiten, die hierbei beteiligt sein könnten, zu erhalten. Die Analyse ergab, dass die Resonanzfrequenz in juvenilen als auch in adulten Sternzellen weitestgehend im θ -Bereich (2-15 Hz) lag. Die mittlere Resonanzfrequenz am RMP hing – ebenso wie oben für Zelleigenschaften gezeigt – sowohl in juvenilen als auch in adulten Sternzellen linear von der dorso-ventralen Position ab. Ein steilerer Anstieg mit leicht geringerer Variabilität der linearen Beziehung zwischen Resonanzfrequenz und Position wurde in adulten Sternzellen beobachtet (Abb. 16, Tab. 3). Die mittlere Resonanzfrequenz am RMP der beiden Versuchsgruppen war in ventralen Sternzellen signifikant geringer als in dorsalen. Zusätzlich war zu erkennen, dass sich die beiden Altersgruppen hauptsächlich in der mittleren Resonanzfrequenz dorsaler Sternzellen unterscheiden. Trägt man die mittlere Resonanzfrequenz und den mittleren Q-Faktor gegen das Membranpotential auf, so wird eine Reduktion der Frequenz als auch des Q-Faktors bei Depolarisation deutlich, welches auf Leitfähigkeiten hindeutet, die bei Depolarisation abnehmen (Abb. 16, Tab. 3). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Unterschiede der Resonanzfrequenz zwischen juvenilen und

3. Ergebnisse

adulten Sternzellen nicht am depolarisierten Membranpotential zu beobachten sind und der Q-Faktor sich zwischen den beiden Altersgruppen nur unmerklich am RMP unterscheidet.

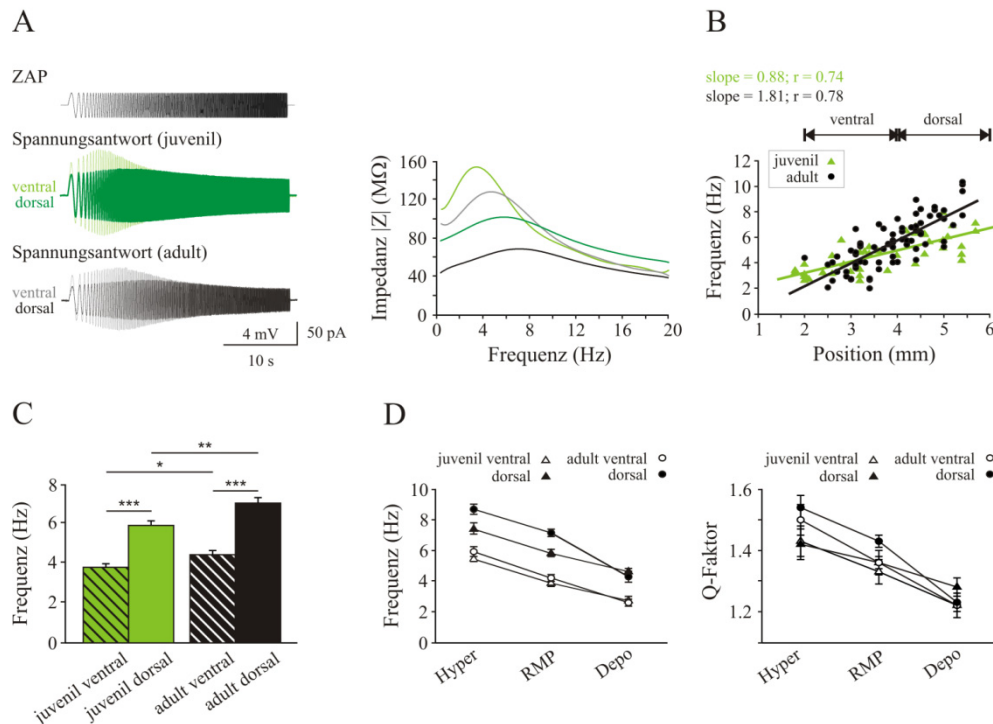


Abbildung 16: Resonanzfrequenzanalyse von Sternzellen in Schicht II des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von der neuronalen Spannungsantwort auf eine sinusförmige Strominjektion (ZAP) mit konstanter Amplitude und linear ansteigender Frequenz (0 -20 Hz; links) am Ruhemembranpotential. Das resultierende Impedanzprofil der gezeigten Aufnahmen (rechts). B) Die Resonanzfrequenz ist für jede individuelle Sternzelle beider Gruppen gegen die anatomische Position aufgetragen. C) Die quantitative Analyse der Resonanzfrequenz am Ruhemembranpotential ist in einem Balkendiagramm verdeutlicht. D) Die quantitative Analyse der Resonanzfrequenz als Funktion des Membranpotentials (links) und des Qualitätsfaktors (Q-Faktor) als Funktion des Membranpotentials (rechts). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

3.2.3 MPOs in Abhängigkeit von der dorso-ventralen Position und dem Alter

Sternzellen der Schicht II zeigen rhythmische MPOs am Schwellenpotential im θ -Frequenzbereich auf (Alonso & Llinás, 1989). Es wird angenommen, dass sie aus dem Zusammenspiel einzelner spannungsabhängige Ionenkanäle entstehen (White et al., 1998; Dickson et al., 2000; Fransen et al., 2004; Erchova et al., 2004; Schreiber et al., 2004) und zur Netzwerkdynamik beitragen können (Acker et al., 2003). Wie auch schon für die Resonanzfrequenz beschrieben, konnte auch für die Frequenz der MPOs eine lineare Abhängigkeit der Position beobachtet werden (Abb. 17). Die Frequenz nahm entlang der dorso-ventralen Achse zu, wobei sich hier jedoch kein Unterschied zwischen den untersuchten Altersgruppen fand. Im Gegensatz zur Frequenz korrelierte die Power der MPOs weder mit der Position noch mit dem Alter der Tiere. Dies könnte bedeuten, dass MPOs im Gegensatz zu

3. Ergebnisse

Resonanz ein qualitatives Phänomen sind. MPOs würden demnach von denselben Leitfähigkeiten abhängen wie Resonanz aber weniger stark als diese auf die Stärke der Expression reagieren.

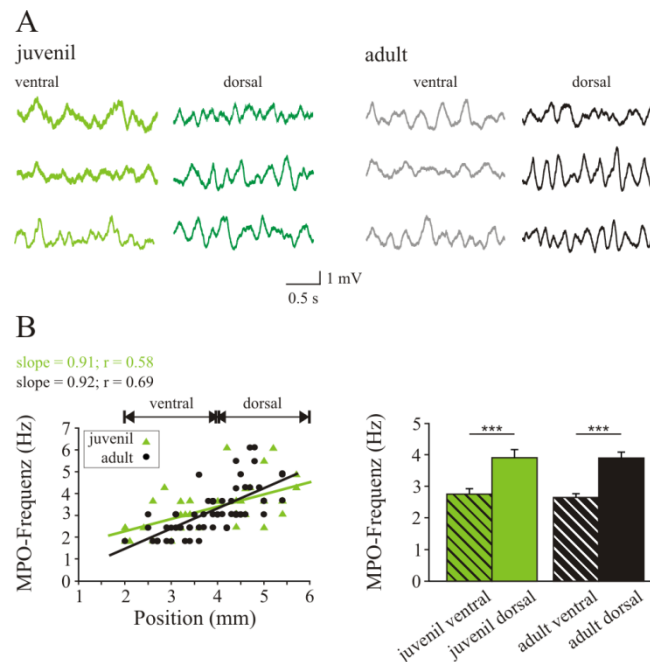


Abbildung 17: Frequenzanalyse von MPOs von Sternzellen in Schicht II des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von MPOs an dem Schwellenpotential von juvenilen und adulten Ratten in Abhängigkeit ihres dorso-ventralen Gradienten (1-3 s lange Datenstücke; ventral: 2-4 mm Interaural; dorsal: 4-6 mm Interaural). B) Die Frequenzen der MPOs von Einzellzellen sind separat in Abhängigkeit zur anatomischen Position dargestellt (links). Die quantitative Analyse der Frequenzen ist in einem Balkendiagramm verdeutlicht (rechts). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (***: $p < 0.001$).

3.2.4 Die AP-Analyse in Hinblick auf das Resonanzverhalten

In theoretischen Modellen wurde die Beziehung zwischen dem Resonanzverhalten und der Nachhyperpolarisation eines AP und ihre gemeinsamen Rolle für die Übersetzung von unterschwelliger Resonanz in überschwelliges *Cluster*-Verhalten von APs (*Cluster*: zeitlich isolierte Anhäufung von schnell aufeinander folgenden APs) besonders hervorgehoben (Engel et al., 2008). Das bedeutet, dass sich in resonanten Zellen ein Zusammenhang zwischen dem Verlauf der biphasischen Nachhyperpolarisation (AHP) und dem Entladungsverhalten aufzeigen lassen könnte. Bei genauem Betrachten der AHP zeigte sich, dass diese – zwar weniger deutlich – ebenfalls von Alter und Position entlang des dorso-ventralen Achse abhängig ist (Tab. 2). So wurde deutlich, dass sich die schnelle AHP (fAHP) vorwiegend mit dem Alter verändert. Die Dauer der mittleren AHP (mAHP) verringerte sich ebenso. Auch war die Dauer des ersten ausgelösten AP von den gleichen Variablen abhängig. Interessanterweise konnte eine Korrelation zwischen AP-Dauer und der Resonanzfrequenz am RMP festgestellt werden. Diese

3. Ergebnisse

Abhängigkeit wurde auch bei der Korrelation der mAHP-Dauer und der Resonanzfrequenz deutlich ($r = 0.44$; $p = 0.001$).

Parameter	Juvenil		Adult		p
	ventral (n)	dorsal (n)	ventral (n)	dorsal (n)	
RMP (mV)	-58.4 ± 0.6 (28)	-59.7 ± 0.8 (20)	-59.7 ± 0.4 (45)	-59.4 ± 0.5 (34)	n.s.
R_{input} (M Ω)	100.0 ± 6.3 (28)	61.1 ± 4.0 (20)	68.4 ± 3.0 (45)	48.0 ± 1.7 (34)	***, +++, ###, §§
Tau (ms)	17.2 ± 1.0 (28)	10.1 ± 0.6 (20)	13.5 ± 0.5 (45)	8.9 ± 0.4 (34)	***, +++, ###
Schwellenpotential (mV)	-42.7 ± 0.6 (28)	-41.4 ± 0.9 (20)	-41.1 ± 0.4 (45)	-40.9 ± 0.6 (34)	*
Rheobase (pA)	85.0 ± 8.0 (28)	176.5 ± 18.0 (20)	136.5 ± 9.1 (45)	227.7 ± 15.2 (34)	***, +++, ###, §
SAG-Tau (ms)	35.1 ± 2.8 (21)	24.1 ± 1.2 (14)	26.5 ± 1.2 (44)	20.8 ± 0.8 (34)	**, +++, ##, §
AP-Latenz (ms)	143.8 ± 20.7 (28)	91.1 ± 24.4 (20)	103.4 ± 11.3 (45)	57.5 ± 8.2 (34)	++
fAHP-Amplitude (mV)	4.6 ± 0.4 (28)	4.5 ± 0.4 (19)	7.5 ± 0.3 (43)	6.6 ± 0.3 (34)	+, ###, §§§
DAP-Amplitude (mV)	1.0 ± 0.2 (28)	1.2 ± 0.3 (19)	1.4 ± 0.1 (43)	1.2 ± 0.2 (34)	n.s.
mAHP-Amplitude V_{th} (mV)	-7.8 ± 0.5 (28)	-8.8 ± 0.3 (20)	-9.6 ± 0.3 (45)	-9.1 ± 0.2 (34)	**
mAHP-Amplitude DAP (mV)	-4.2 ± 0.4 (28)	-5.1 ± 0.6 (19)	-3.3 ± 0.3 (43)	-3.4 ± 0.3 (34)	#, §§
mAHP-Halbbreite (ms)	95.7 ± 10.7 (25)	78.6 ± 3.7 (15)	83.9 ± 6.9 (41)	57.0 ± 4.8 (31)	++, §§§
AP-Halbbreite (ms)	1.02 ± 0.02 (28)	0.88 ± 0.03 (20)	0.93 ± 0.02 (45)	0.78 ± 0.02 (34)	***, +++, ##, §§

Tabelle 2: Zusammenfassung der wesentlichen Parameter des Entladungsverhaltens von Sternzellen des mEC in Abhängigkeit von Position und Alter. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SEM. Die Signifikanzen sind folgendermaßen angegeben: * juvenil ventral gegen dorsal, + adult ventral gegen dorsal, # juvenil ventral gegen adult ventral und § juvenil dorsal gegen adult dorsal (ein Symbol $p < 0.05$, zwei $p < 0.01$, drei $p < 0.001$, n.s. nicht signifikant).

3. Ergebnisse

Parameter	Juvenil		Adult		p
	ventral (n)	dorsal (n)	ventral (n)	dorsal (n)	
Resonanz bei Depolarisation					
Frequenz (Hz)	2.8 ± 0.3 (16)	4.7 ± 0.2 (17)	2.6 ± 0.2 (27)	4.2 ± 0.3 (28)	***, +++
Q-Faktor	1.22 ± 0.04 (16)	1.27 ± 0.03 (17)	1.22 ± 0.04 (27)	1.23 ± 0.03 (28)	n.s.
Resonanz am RMP					
Frequenz (Hz)	3.8 ± 0.2 (23)	5.9 ± 0.2 (19)	4.5 ± 0.2 (42)	7.1 ± 0.3 (33)	***, +++, #, §§
Q-Faktor	1.29 ± 0.03 (23)	1.37 ± 0.04 (19)	1.34 ± 0.02 (42)	1.41 ± 0.02 (33)	+
Resonanz bei Hyperpol.					
Frequenz (Hz)	5.6 ± 0.3 (21)	7.5 ± 0.4 (19)	5.8 ± 0.3 (32)	8.6 ± 0.3 (27)	***, +++, §
Q-Faktor	1.43 ± 0.04 (21)	1.52 ± 0.08 (19)	1.51 ± 0.05 (32)	1.53 ± 0.05 (27)	n.s.
MPO-Frequenz (Hz)	2.8 ± 0.2 (18)	3.9 ± 0.3 (18)	2.7 ± 0.1 (37)	3.9 ± 0.2 (27)	***, +++
MPO-Power (mv ² /Hz)	0.10 ± 0.02 (18)	0.06 ± 0.01 (18)	0.12 ± 0.2 (37)	0.10 ± 0.01 (27)	n.s.

Tabelle 3: Zusammenfassung des Resonanzverhaltens und der MPOs von Sternzellen des mEC in Abhängigkeit von Position und Alter. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert ± SEM. Die Signifikanzen sind folgendermaßen angegeben: * juvenil ventral gegen dorsal, + adult ventral gegen dorsal, # juvenil ventral gegen adult ventral und § juvenil dorsal gegen adult dorsal (ein Symbol p < 0.05, zwei p < 0.01, drei p < 0.001, n.s. nicht signifikant).

3.3 PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER RESONANZ

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, ist die Resonanz von Sternzellen im mEC keine konstante Eigenschaft. Sie ist vielmehr abhängig von dem Entwicklungsstadium, der anatomischen Position entlang der dorso-ventralen Achse und vom Membranpotential. Es wird angenommen, dass bestimmten Leitfähigkeiten die Vorraussetzung für Resonanz darstellen. Diese Leitfähigkeiten müssen demnach die gleichen Vorraussetzungen erfüllen (Entwicklungs-, Positions- und Spannungsabhängigkeit). Hier kommen insbesondere die Ströme I_M , I_h und I_{NaP} in Betracht. Es ist momentan nicht ausreichend pharmakologisch untersucht, wie die Resonanz von

Sternzellen des mEC durch diese moduliert werden kann. Um die Rolle und die Wirkung der Ströme I_M , I_h und I_{NaP} auf passive und aktive Membraneigenschaften zu untersuchen, wurde mittels der *Patch-Clamp*-Technik (Ganzzellableitung) im Stromklemmmodus von 52 Sternzellen in der Schicht II des mEC in Anwesenheit verschiedener Pharmaka (ICA-110381, Retigabin, XE991, ZD7288, Losigamon) abgeleitet (Serienwiderstand: $15.8 \pm 0.6 \text{ M}\Omega$; $n = 52$).

Für die folgenden Betrachtungen ist es hilfreich sich zu verdeutlichen, dass die wesentlichen Parameter der Membranwiderstand (oder auch die Impedanz bei $f = 0 \text{ Hz}$, $|Z_0|$), die maximale Amplitude der Spannungsantwort ($|Z_{\max}|$) und der Qualitätsfaktor der Resonanz (Q-Faktor), der sich aus dem Quotient von $|Z_{\max}|$ und $|Z_0|$ ergibt, sind. Dabei ist der Q-Faktor das entscheidende Kriterium für die Resonanz. Das heißt zum Beispiel, dass, wenn eine experimentelle Manipulation ausschließlich den ohmschen Widerstand der Zelle verändert, sich sowohl $|Z_0|$ als auch $|Z_{\max}|$ ändern – nicht jedoch der Q-Faktor. Auch haben augenscheinliche Veränderungen in der Differenz zwischen $|Z_0|$ und $|Z_{\max}|$ nicht notwendigerweise gleichsinnige Veränderungen des Q-Faktors zur Folge (zum Beispiel Abb. 16A, juvenil-ventral versus adult-dorsal).

Ein weiterer Faktor, der bei frequenzabhängigen Phänomenen zu beachten ist, stellt die Membranzeitkonstante dar. Sie liegt in adulten Sternzellen im Bereich von 10 ms. Das bedeutet, dass der entsprechende Tiefpassfilter eine Grenzfrequenz besitzt und damit die zu beobachteten Frequenzphänomene nach oben begrenzt. Auch ist zu beachten, dass die Membranzeitkonstante vom Membranwiderstand und der Membrankapazität abhängt und somit Veränderungen des Membranswiderstands die Grenzfrequenz ändern. Weiterhin kann sich das Volumen der Zelle sowohl artifiziell als auch als aufgrund der Blockade von Leitfähigkeiten, die sekundär zur Aktivierung der Volumenregulation führen während der Messung ändern und so die Membrankapazität beeinflussen.

3.3.1 Die Wirkung von KCNQ/Kv7/M-Kanal-Modulatoren auf passive und aktive Membraneigenschaften

I_M ist ein unterschwelliger, nicht inaktivierender Kaliumstrom, welcher für die Generation von sogenannten AP-Salven, von Resonanz im θ -Bereich und von MPOs von Bedeutung ist. Es ist bisher nicht abschließend geklärt, wie I_M -Modulatoren auf die Resonanz Einfluss nehmen.

3.3.1.1 Der Einfluss der M-Strom Aktivatoren ICAGEN-110381 und Retigabin

Der Effekt der I_M -Aktivatoren auf die neuronale Erregbarkeit von Sternzellen wurde unter Anwendung verschiedener experimenteller Protokolle im Stromklemm-Modus (*Current-Clamp*) untersucht. Zum einen wurde ein Stufenprotokoll verwendet, bei dem Ströme mit einer Amplitude von -400 bis 400 pA über 500 ms in 10 pA Schritten in die Zelle sowohl unter

3. Ergebnisse

Kontrollbedingungen als auch in Anwesenheit von 10 μM ICA-110381 (ICA) bzw. 1 μM Retigabin (RTG) nach eine Applikationszeit von ~ 15 min injiziert wurden (Abb. 18). Bei depolarisierten Membranpotentialen (> -60 mV) sind die M-Kanäle teilweise aktiviert (Halliwell & Adams, 1982; Hu et al., 2002) und demzufolge kann hier eine verstärkte Aktivität dieser Kanäle erwartet werden. Der Membranwiderstand nahm signifikant unter Applikation von ICA ab, blieb aber unter RTG unverändert. Das RMP verringerte sich nur unter RTG. Nach Applikation von ICA war das Schwellenpotential für APs in die depolarisierte Richtung verschoben und auch der dazu erforderliche zu injizierende Strom (Rheobase) war stark erhöht. Unter ICA blieb sowohl die Zeitkonstante der Membran als auch die des SAG-Potentials unverändert.

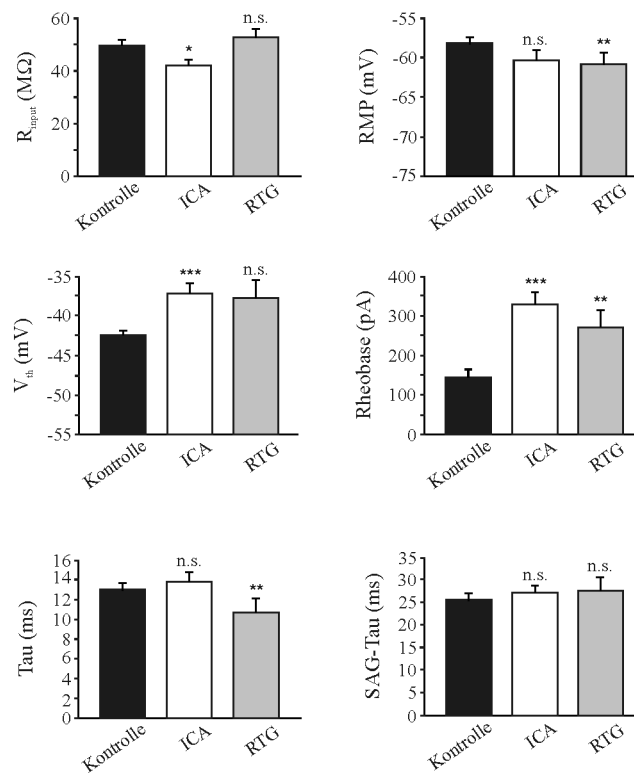


Abbildung 18: Analyse der Sternzeleigenschaften unter ICA (n = 12) oder RTG (n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

3. Ergebnisse

Es fanden sich auch signifikante Veränderungen des ersten ausgelösten APs hinsichtlich der Amplitude, der Dauer, der AHP sowie der AP-Frequenz (Abb. 19).

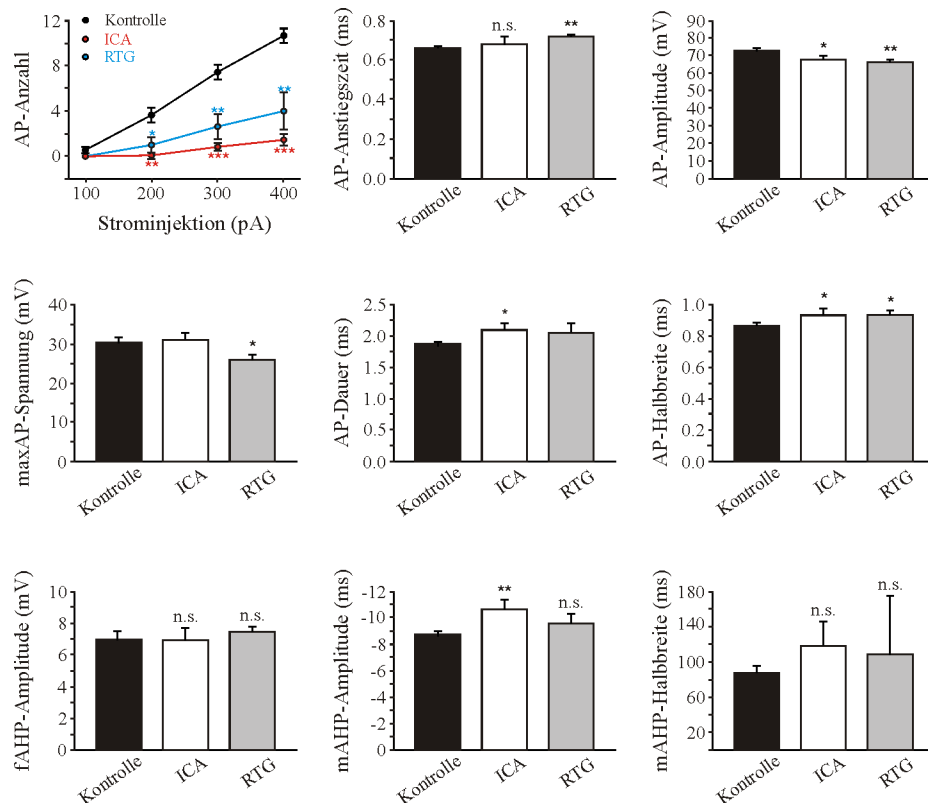


Abbildung 19: AP-Analyse unter ICA (n = 12) oder RTG (n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Trotz der Variabilität der Effekte beider Pharmaka lassen sie sich zusammenfassen als eine Erhöhung der Rheobase, des Schwellenpotentials bei geringfügiger Abnahme des Ruhemembranpotentials und leichtem Anstieg der mAHP-Amplitude. Die leichten Veränderungen der AP-Kinetik können als sekundärer Effekt aufgrund der verspäteten Aktionspotentialauslösung und verstärkter Natriumkanalinaktivierung betrachtet werden. Diese Beobachtungen sind für Aktivatoren des I_M zu erwarten, wobei die Abweichungen zwischen ICA und RTG eventuell unterschiedlichen Spezifitäten – auch für andere Kanäle – geschuldet sein könnten. Es ist weiterhin anzumerken, dass es zu keiner drastischen Veränderung der mAHPs kam, was darauf hindeuten könnte, dass entweder in Sternzellen das mAHP nicht weiter verstärkt werden kann oder es nicht primär vom I_M getragen wird.

Um eine mögliche Wirkung von M-Kanal-Aktivatoren auf das intrinsische Resonanzverhalten von Sternzellen zu untersuchen, wurde ein ZAP-Strom injiziert (Abb. 20). Die resultierenden Spannungsantworten wurden vor und 15 min nach Applikation von ICA (10 μ M) beziehungsweise RTG (1 μ M) bei drei verschiedenen Potentialen registriert. Unter

3. Ergebnisse

Badapplikation der I_M -Aktivatoren ICA und RTG wurde eine Beeinflussung des Resonanzverhaltens mit zunehmender Depolarisation deutlich. Interessanterweise wurde die Frequenz ohne Beeinträchtigung des Q-Faktors bei Depolarisation signifikant erhöht. Die geringere Bandbreite deutet auf eine engere Frequenzpräferenz hin. Die Zunahme des D-Wertes wird hauptsächlich durch die Abnahme der Impedanz ($|Z_0|$), die mit Depolarisation verstärkt wird, getragen.

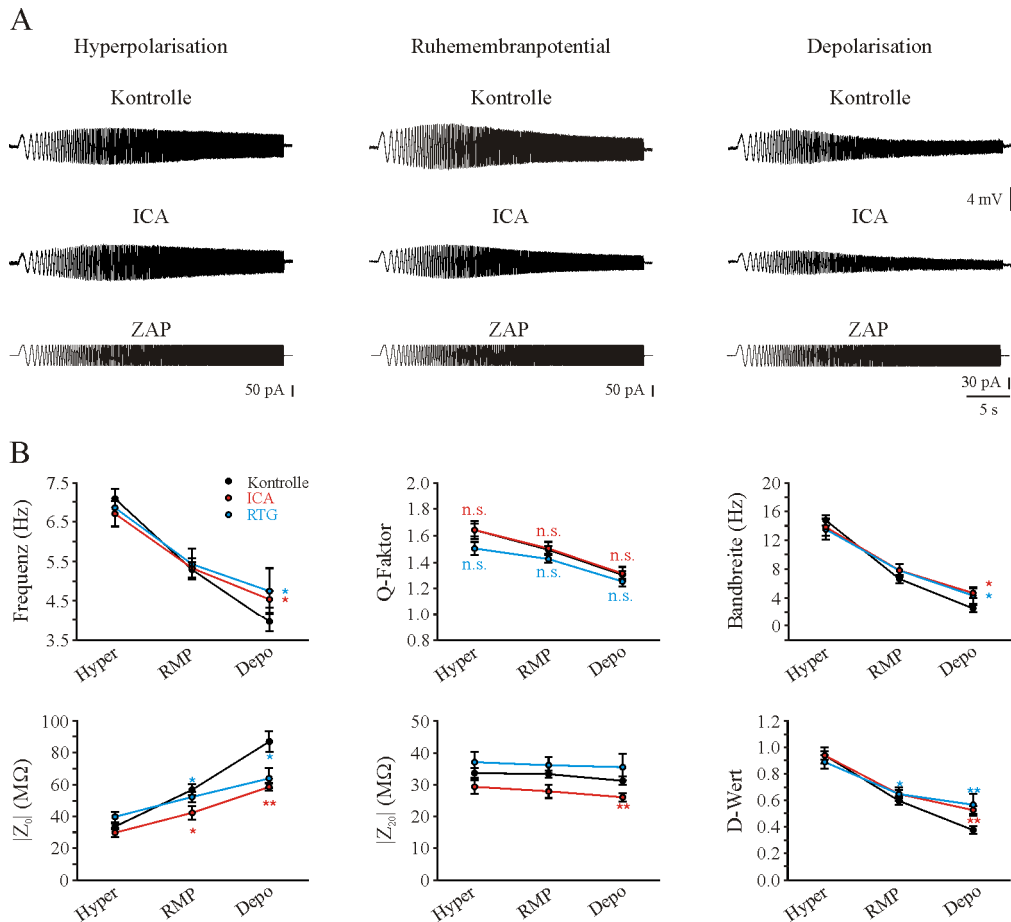


Abbildung 20: Wirkung von ICA und RTG auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von Resonanz bei drei verschiedenen Membranpotentialen in der Kontrolle und nach Applikation von 10 μ M ICA. Man beachte die veränderte Stimulusamplitude bei depolarisiertem Membranpotential. B) Quantitative Analyse der Resonanzfrequenz, des Q-Faktors, der Resonanzbandbreite, der Impedanz ($|Z|$) bei 0 Hz ($|Z_0|$) und bei 20 Hz ($|Z_{20}|$) und des D-Wertes an verschiedenen Potentialen unter Kontrollbedingungen und nach Badapplikation von ICA (Hyper: n = 12; RMP: n = 12; Depo: n = 9) oder RTG (Hyper: Hyperpolarisation; n = 7; RMP: Ruhemembranpotential; n = 8; Depo: Depolarisation; n = 6). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Aktivatoren des M-Stroms die Resonanz von Sternzellen nur hinsichtlich ihrer Frequenz beeinflussen. Dieser Effekt war nur während einer Depolarisation zu beobachten, was zum Aktivierungsprofil von I_M passt. Es fand sich keine

Beeinflussung von MPOs durch beide Substanzen (nicht gezeigt). Die Interpretation der Daten wird jedoch dadurch erschwert, dass RTG unter anderem auch Natriumleitfähigkeiten blockieren kann (Rundfeld & Netzer, 2000), was für die relativ neue Substanz ICA auch nicht ausgeschlossen werden kann. Daher sollten nun die erhaltenen Ergebnisse mit denen einer I_M -Blockade verglichen werden.

3.3.1.2 Die Wirkung des M-Kanal-Blockers XE991

Der I_M -Blocker XE991 wurde bereits in einer Reihe von Studien (zum Beispiel Shah et al., 2008) erfolgreich verwendet und erhöht die Erregbarkeit von Neuronen. Im Gegensatz zu Aktivatoren des M-Stroms erhöhte XE991 (10 μ M) im Wesentlichen nur das Ruhemembranpotential (Abb. 21), was das verbreiterte AP (Abb. 22) aufgrund von Natriumkanalinaktivierung erklären könnte. Im Gegensatz zur ICA und RTG sind die Rheobase und das Schwellenpotential für APs von XE991 nicht beeinflusst. Das könnte bedeuten, dass unter Ruhebedingungen eine geringe I_M -Dichte ausreichend ist, um das RMP zu modulieren, nicht jedoch die Rheobase und das Schwellenpotential. Die Öffnung sämtlicher M-Kanäle durch ICA und RTG könnte jedoch effektiver in der Modulation dieser beiden Parameter sein.

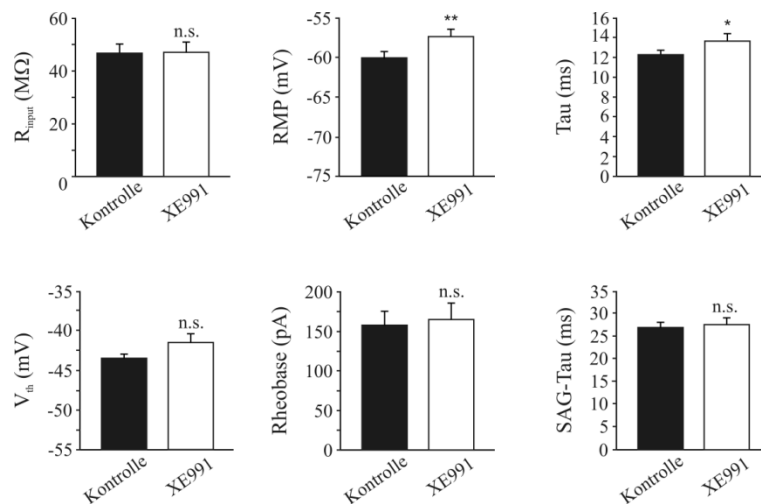


Abbildung 21: Analyse der Zelleigenschaften unter XE991 (n = 11). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$) und n.s. steht für nicht signifikant.

3. Ergebnisse

Das Entladungsverhalten – in Abhängigkeit von der Amplitude des injizierten Stroms – bestätigte, dass unter Ruhebedingungen eine relativ geringe verfügbare I_M -Dichte vorhanden ist, da deren Blockade keinen wesentlichen Einfluss hatte (Abb. 22).

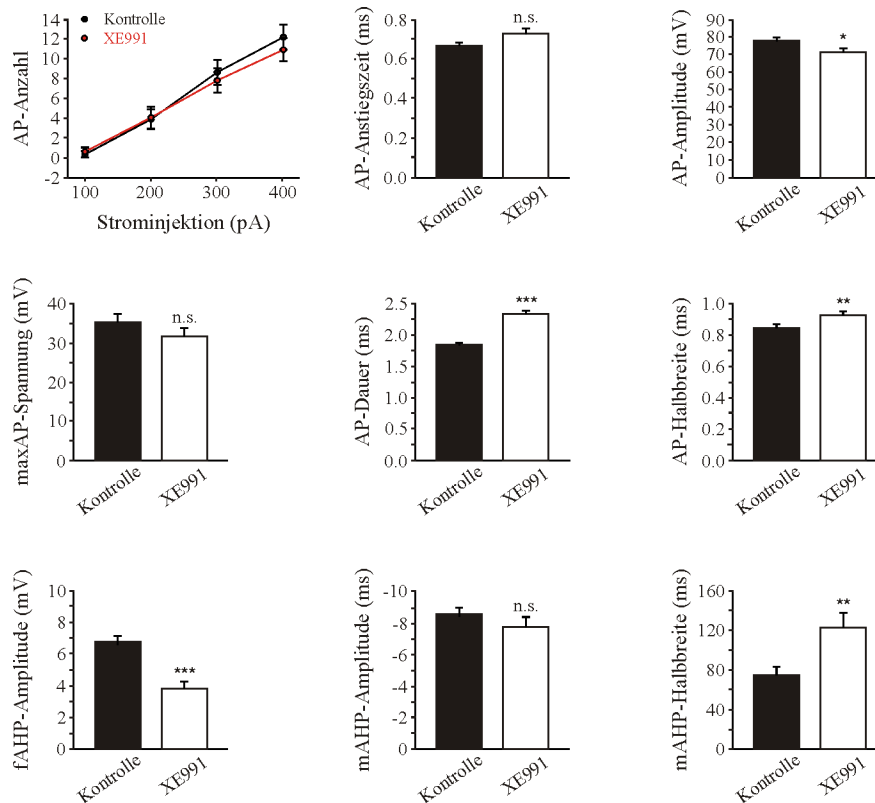


Abbildung 22: AP-Analyse unter XE991 (n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Im Weiteren erhöhte XE991 die Halbbreite aber nicht die Amplitude der mAHP. Die Amplitude der fAHP war hingegen deutlich reduziert (Abb. 22). Zusammen mit den ebenfalls recht heterogenen Ergebnissen mit ICA und RTG lässt sich also kein klarer Effekt von I_M auf die mAHP identifizieren. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen an Sternzellen überein (Yoshida & Alonso, 2007).

Unter XE991 war an gleichen Potentialen im Gegensatz zu den vorher gezeigten M-Kanal-Aktivatoren keine deutliche Beeinflussung des Resonanzverhaltens zu beachten (Abb. 23). Eine leichte Tendenz zur Abnahme der Frequenz und des Q-Faktors wurde sichtbar, jedoch waren diese Beobachtungen nicht signifikant. Dieser Befund zeigte, dass der I_M in einem zu vernachlässigendem Maße Einfluss auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC ausübt und demzufolge nicht die Hauptkomponente darstellt. Da das Hauptaugenmerk dieser Studie auf der unterschwellige Resonanz lag, wurde bisher von einer vermehrten Depolarisation unter TTX, um APs zu verhindern, Abstand genommen.

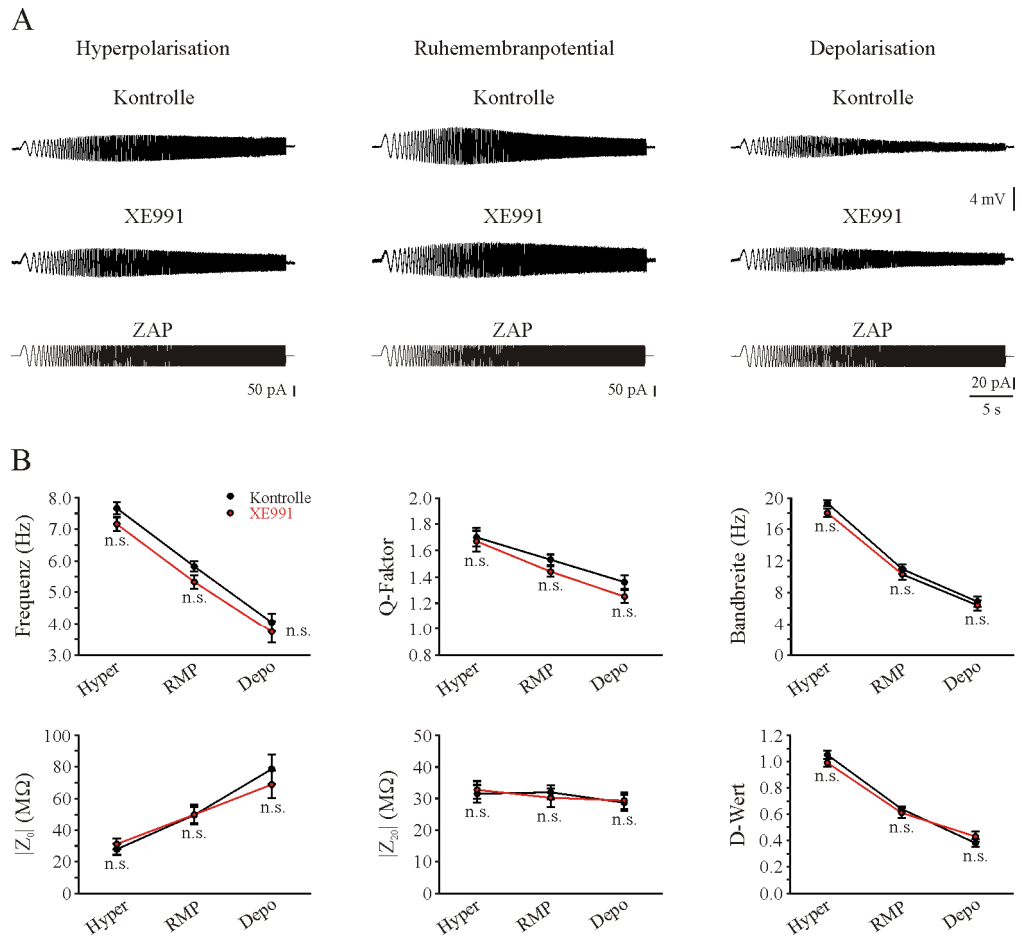


Abbildung 23: Wirkung von XE991 auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von Resonanz bei drei verschiedenen Membranpotentialen in der Kontrolle und nach Applikation von XE991 (10 μ M). Man beachte die veränderte Stimulusamplitude bei depolarisiertem Membranpotential. B) Quantitative Analyse der Resonanzfrequenz, des Q-Faktors, der Resonanzbandbreite, der Impedanz ($|Z|$) bei 0 Hz ($|Z_0|$) und bei 20 Hz ($|Z_{20}|$) und des D-Wertes an verschiedenen Potentialen (Hyper: Hyperpolarisation; n = 11; RMP: Ruhemembranpotential; n = 10; Depo: Depolarisation; n = 9; n.s. steht für nicht signifikant).

Der durch M-Kanäle getragene I_M hat also in Sternzellen unter Ruhebedingungen einen geringfügigen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit, kann jedoch bei pharmakologischer Verstärkung deutlich die Aktivität dämpfen. In Hinblick auf die für MPOs und Resonanz relevanten mAHP, zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur kein klares Bild. Im Einklang mit einer geringen I_M -Dichte, zeigten sich auch keine deutlichen Effekte auf die Resonanz von Sternzellen.

3.3.2 Der Einfluss von I_h auf passive und aktive Membraneigenschaften

Eine Vielzahl von zellulären Eigenschaften ist abhängig von Kationenströmen (I_h), die durch Hyperpolarisation aktiviert werden, welche die synaptische Integration kontrollieren und so verschiedene Formen von Lern- und Gedächtnisprozessen beeinflussen. Zu diesen Eigenschaften

3. Ergebnisse

gehören: SAG-Tau, *Rebound*, MPOs und Resonanz. Um genauer die Rolle des I_h in Sternzellen zu beschreiben, wurden unterschiedliche Zelleigenschaften unter Kontrollbedingungen und nach Applikation des HCN-Kanalblockers ZD7288 (20 μ M) untersucht.

Die charakteristischen Spannungsantworten von Sternzellen auf 500 ms lange Strominjektionen in hyper- und depolarisierender Richtung wurden wie folgt beeinflusst: Anstieg des Membranwiderstandes, Abnahme des RMPs, der Rheobase, Zunahme der Membranzeitkonstante, der AP-Latenz und der SAG-Ratio (Abb. 24).

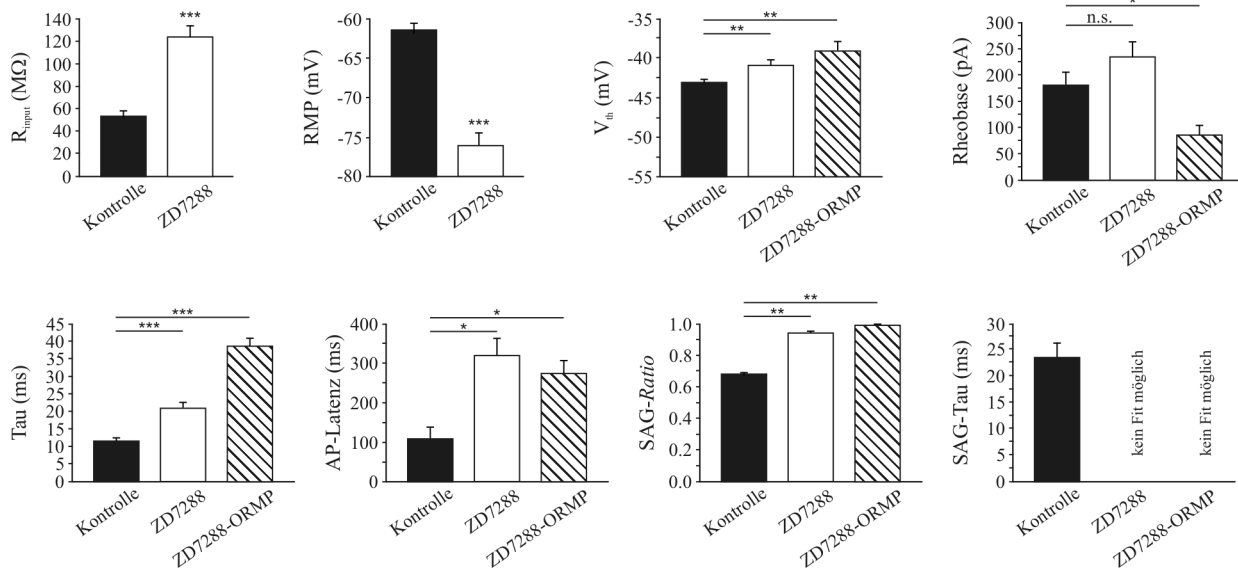


Abbildung 24: Analyse der Zelleigenschaften unter ZD7288 (n = 9). Ein Teil der Messungen wurde wegen des drastischen Effekts auf das Ruhemembranpotential ebenfalls am Kontrollmembranpotential durchgeführt (ORMP; n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Diese Beobachtungen sind alle bei einer Blockade von I_h zu erwarten. Sie fallen in Sternzellen besonders deutlich aus (zum Beispiel im Vergleich mit Pyramidenzellen), was darauf hindeutet, dass sie über I_h mit besonders hoher Dichte verfügen. Es stellte sich weiterhin heraus, dass I_h wichtig für die geringe Latenz des APs in Sternzellen ist. Das erste AP sitzt zumeist auf dem positiven SAG-Potential. Da ZD7288 zu einer Verschiebung des RMPs in hyperlarisierende Richtung verursachte, waren APs unter ZD7288 erwartungsgemäß schwerer auszulösen. Nach Kompensation der Hyperpolarisation durch einen depolarisierenden Haltestrom ließen sich APs jedoch mit geringeren Strominjektionen auslösen - wahrscheinlich wegen der verringerten Rheobase (Abb. 24). Die AP-Kinetik war zwar leicht aber signifikant verändert. Unter ZD7288 verschwand die mAHP nahezu vollständig (Abb. 24), was bereits für Pyramidenzellen der CA1 Region bekannt ist (Velumian & Carlen, 1999).

3. Ergebnisse

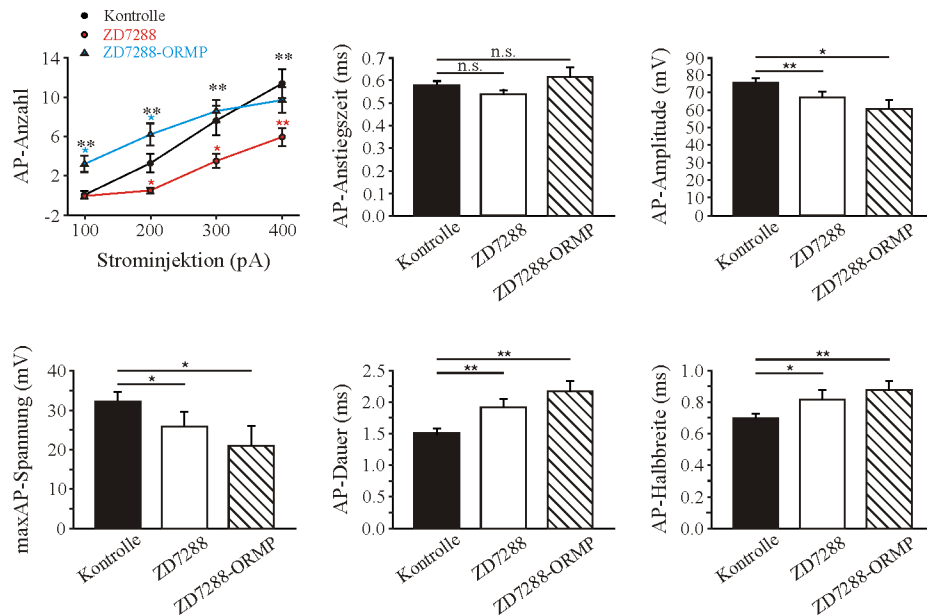


Abbildung 25: AP-Analyse unter ZD7288 (n = 9 für die AP-Anzahl, ansonsten n = 5). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Unter der Annahme, dass sich sowohl MPOs als auch Resonanz auf die Anwesenheit von I_h begründen, wurde diese im Folgenden untersucht. ZD7288 reduzierte sowohl die Frequenz als auch die Power der MPOs. Der Effekt wurde besonders deutlich, wenn am gleichen Potential wie unter Kontrollbedingungen (~ -50 mV) und unter ZD7288 Behandlung analysiert wurde. Die MPO-Frequenz von 2.8 ± 0.3 Hz ($n = 8$) mit einer Power von durchschnittlich 0.21 ± 0.05 mV²/Hz wurde durch ZD7288 auf 2.1 ± 0.2 Hz ($n = 8$; $p < 0.01$) mit einer Power von 0.08 ± 0.03 mV²/Hz ($p < 0.01$) gemindert.

Sternzellen sind resonant im θ -Bereich an allen hier untersuchten Membranpotentialen. Nachdem sich nach dem Einwaschen von ZD7288 das neue RMP stabil eingestellt hatte, war bei den gleichen Membranpotentialen keine Resonanz mehr vorhanden (Abb. 26). Das Impedanzprofil entsprach nun dem eines reines Tiefpassfilters (siehe auch Einleitung Abb. 4). Während des Einwaschens von ZD7288 kam es vor dem völligen Erliegen der Resonanz zum Abfallen des Q-Faktors bei sinkender Resonanzfrequenz. Das könnte darauf hindeuten, dass allein I_h das induktive Element darstellt und kein Resonanzverstärker ist, da für letzteren kein gleichzeitiges Absinken der Frequenz zu erwarten wäre.

3. Ergebnisse

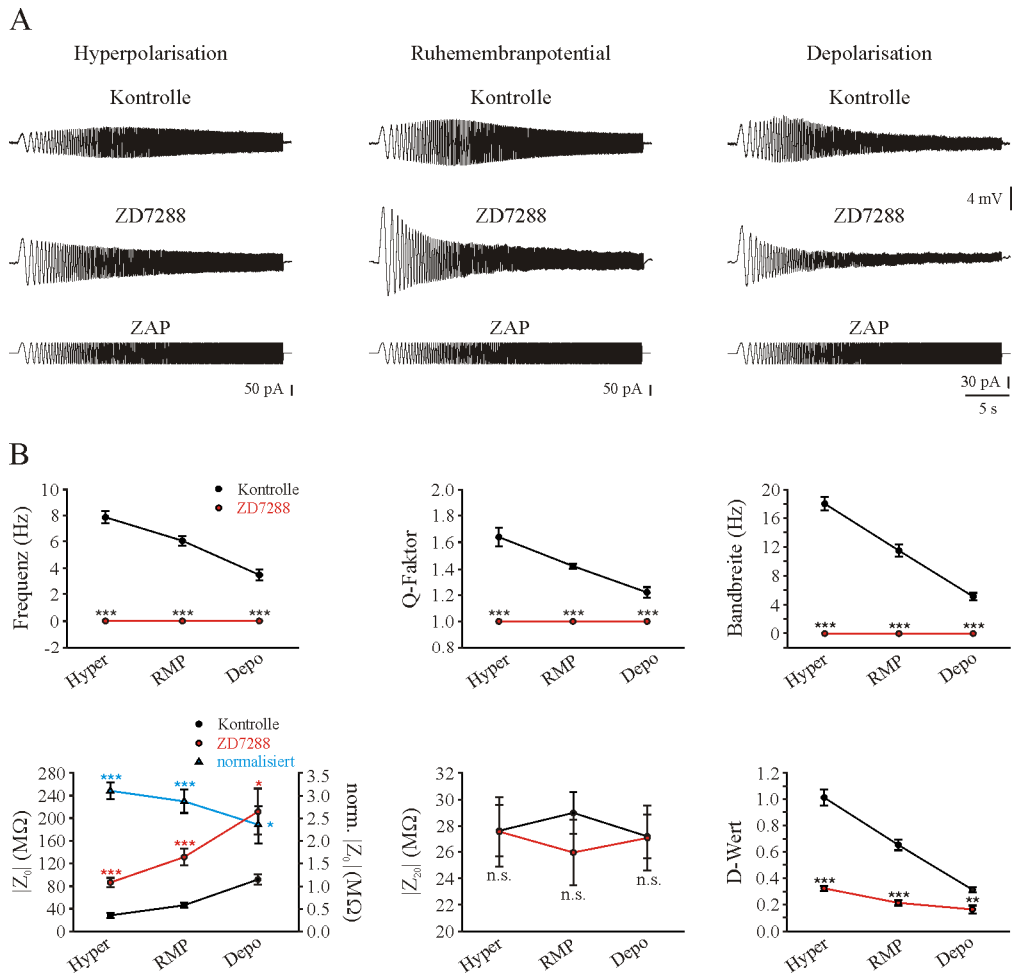


Abbildung 26: Wirkung von ZD7288 auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von Resonanz bei drei verschiedenen Membranpotentialen in der Kontrolle und nach Applikation von ZD7288 (20 μ M). Man beachte die veränderte Stimulusamplitude bei depolarisiertem Membranpotential. B) Quantitative Analyse der Resonanzfrequenz, des Q-Faktors, der Resonanzbandbreite, der Impedanz ($|Z|$) bei 0 Hz ($|Z_0|$) und bei 20 Hz ($|Z_{20}|$) und des D-Wertes an verschiedenen Potentialen (Hyper: Hyperpolarisation; n = 9; RMP: Ruhemembranpotential; n = 9; Depo: Depolarisation; n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Die Abnahme des D-Wertes der Resonanz passt gut zu den Impedanzen an den Frequenzen 0 und 20 Hz. Der starke Abfall dieses Parameters weist ebenfalls darauf hin, dass eine Sternzelle ohne I_h einen reinen Tiefpassfilter darstellt.

Sehr interessant ist weiterhin die Abhängigkeit des Q-Faktors und des D-Wertes vom Membranpotential (Abb. 26). Der Umstand, dass mit zunehmender Depolarisation beide abfallen und der Effekt von ZD7288 nachlässt, deutet darauf hin, dass der durch Hyperpolarisation aktivierte I_h von herausragender Bedeutung für die Resonanz von Sternzellen ist. Man kann also davon ausgehen, dass I_h nicht aber I_M eine notwendige Voraussetzung für die Resonanz von Sternzellen des mEC ist.

3.3.3 Die Wirkung von Losigamon auf passive und aktive Membraneigenschaften

Auch dem persistierenden Natriumstrom (I_{NaP}) wurde Bedeutung für die Resonanz als Verstärker zugewiesen. Es sollte also untersucht werden, ob dies ebenfalls für die I_h -Resonanz von Sternzellen zutrifft. Hierzu wurde der relativ unspezifische I_{NaP} -Blocker Losigamon (200 μ M) eingewaschen und die Zelleigenschaften, inklusive der Resonanz, untersucht. Es stellte sich heraus, dass das Antikonvulsivum Losigamon die Membranzeitkonstante, das Schwellenpotential und die Rheobase erhöhte, was im Wesentlichen mit der teilweisen Blockade von Natriumkanälen in Einklang zu bringen ist (Abb. 27).

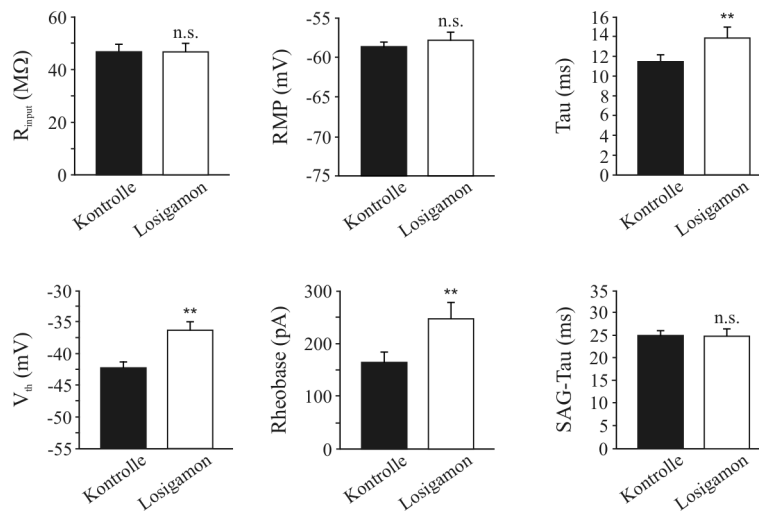


Abbildung 27: Analyse der Sternzeleigenschaften unter Losigamon (n = 11). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (**: $p < 0.01$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Entsprechend sollte Losigamon die individuellen APs von Sternzellen als auch deren Entladungsverhalten verändern. Wie in Abb. 28 zu erkennen ist, senkte Losigamon die Anzahl von generierten APs bei gleicher Strominjektion deutlich ab, ohne die Kinetik bei gleichzeitig reduzierter AP-Amplitude signifikant zu beeinflussen.

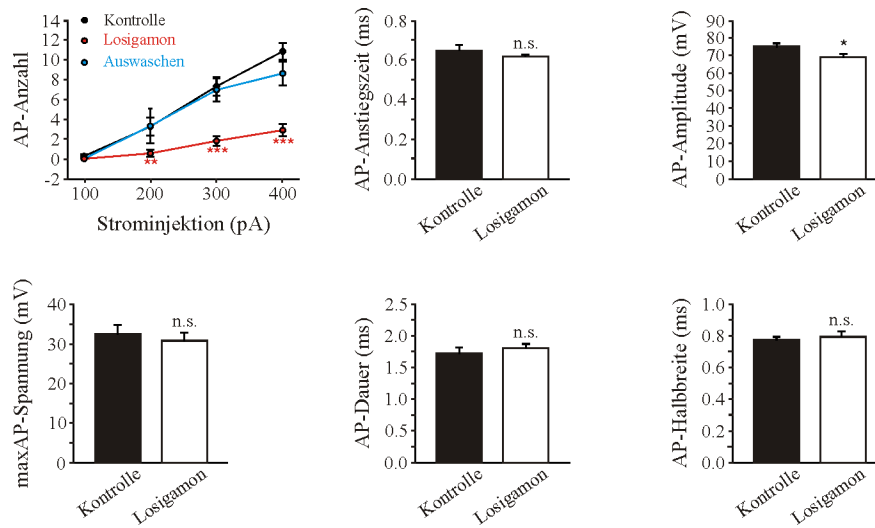


Abbildung 28: AP-Analyse von Sternzellen unter Losigamon (n = 8). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$) und n.s. steht für nicht signifikant.

Wie bereits erwähnt, wird nach bisherigem Wissensstand die Resonanz vom I_h (Frequenz) und vom I_{NaP} (Verstärker) getragen. Unter Losigamon würde man demnach eine Abnahme des Q-Faktors, insbesondere am RMP, ohne größere Veränderung der Frequenz erwarten. Jedoch blieben in entsprechenden Experimenten sowohl die Frequenz als auch die Bandbreite und der Q-Faktor stabil (Abb. 29). Ebenso wie in den vorangegangenen Experimenten sieht man auch hier, dass bei zunehmender Depolarisation Resonanzeffekte nur schwer nachzuweisen sind. Das spricht indirekt gegen einen starken Einfluss von I_{NaP} , da dieser mit zunehmender Depolarisation deutlicher ausgeprägt ist. Weiterhin ist I_{NaP} bei Hyperpolarisation und damit deutlicher Resonanz zum überwiegenden Teil inaktiv (Crill, 1996). Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass Losigamone den I_{NaP} nur ineffizient blockiert, obwohl Losigamon in CA1 Pyramidenzellen eine Effizienz von 90 % zugeschrieben wurde (Gebhardt et al., 2001). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß Glukonat-haltige Intrazellulärlösungen den I_{NaP} beeinträchtigen (Gebhardt et al., 2001).

Abschließend kann die Pharmakologie des Entladungsverhaltens und der Resonanz in Sternzellen des mEC wie folgt zusammengefasst werden: Sternzellen verfügen über den I_h und in geringerem Maße über den I_M und den I_{NaP} . Alle modulieren die untersuchten Parameter, wobei der I_M erst bei verstärkter pharmakologischer Aktivierung deutlich wirksam wird. Im Gegensatz hierzu scheint allein der I_h von großer Bedeutung für die Resonanz von Sternzellen zu sein, was durch die Pharmakologie und die Potentialabhängigkeit der Resonanz untermauert wird.

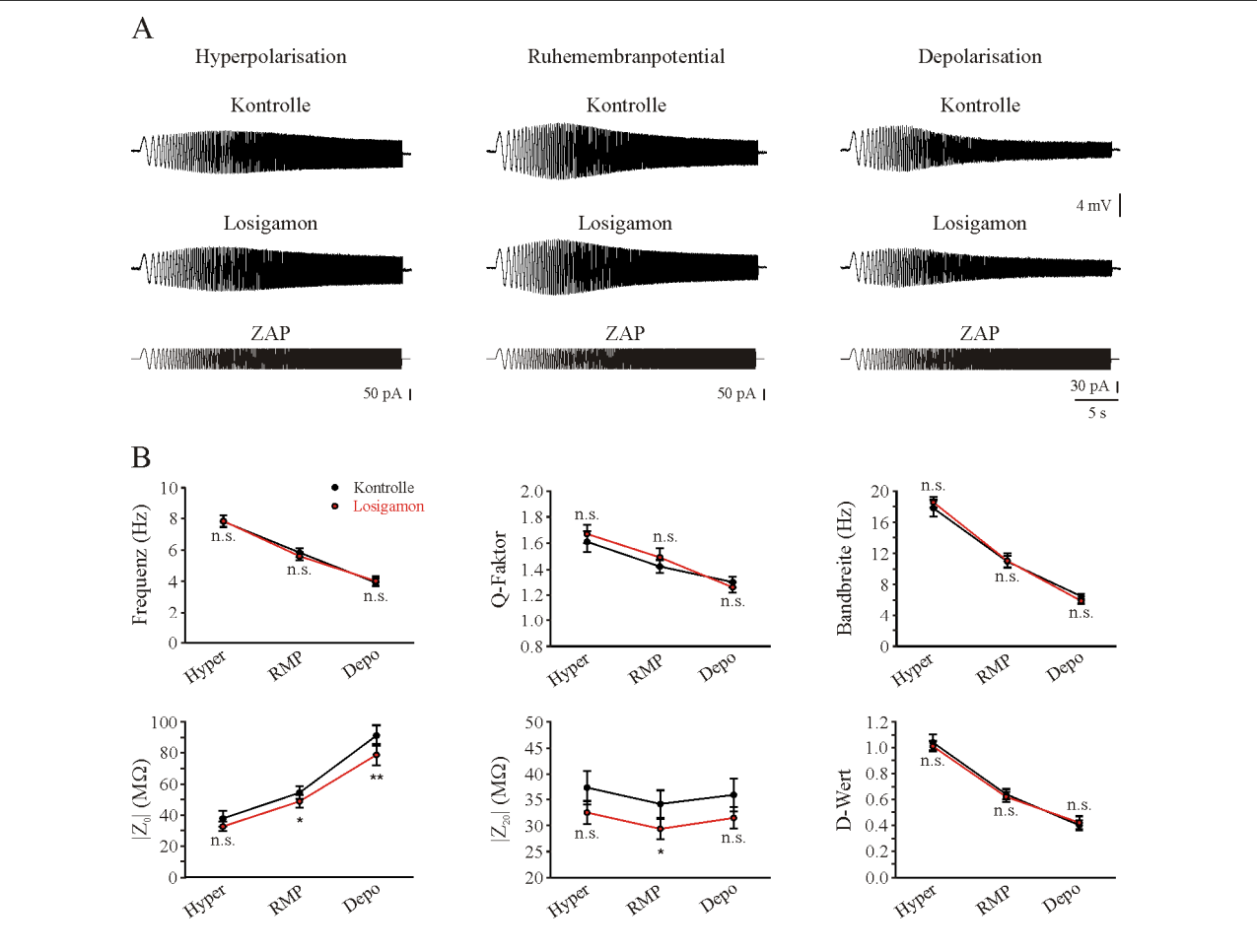


Abbildung 29: Wirkung von Losigamon auf das Resonanzverhalten von Sternzellen des mEC. A) Repräsentative Aufnahmen von Resonanz bei drei verschiedenen Membranpotentialen in der Kontrolle und nach Applikation von Losigamon (200 μ M). Man beachte die veränderte Stimulusamplitude bei depolarisiertem Membranpotential. B) Quantitative Analyse der Resonanzfrequenz, des Q-Faktors, der Resonanzbandbreite, der Impedanz ($|Z|$) bei 0 Hz ($|Z_0|$) und bei 20 Hz ($|Z_{20}|$) und des D-Wertes an verschiedenen Potentialen (Hyper: Hyperpolarisation; n = 10; RMP: Ruhemembranpotential; n = 12; Depo: Depolarisation; n = 9). Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: p < 0.05; **: p < 0.01) und n.s. steht für nicht signifikant.

3.4 RESONANZ UND MPOs IN INTERNEURONEN DER HIPPOKAMPALEN FORMATION

Abgesehen von Sternzellen gibt es noch weitere resonante Interneurone in der hippocampalen Formation. Hier galt das Augenmerk bisher zum Beispiel den Horizontalzellen des Hippokampus (Pike et al., 2000). Die Existenz von Resonanz und MPOs in hemmenden Interneuronen könnte von Bedeutung sein, weil das Wechselspiel von Hemmung und Erregung von entscheidender Bedeutung für die Generation von Netzwerkoszillationen ist (Wang & Buzsáki, 1996; Bartos et al., 2007; Wulff et al., 2009). Die Resonanz oder die MPOs im θ -Bereich in Interneuronen könnte demzufolge einen Mechanismus darstellen, der individuelle Zellen in ein oszillierendes Ensemble rekrutiert. Im Folgenden werden drei Neuronentypen detailliert charakterisiert, die hierfür von potenziellem Interesse sind.

3.4.1 Interneurone mit MPOs aber ohne Resonanz

In der Schicht I-II des mEC der juvenilen Ratte konnte ein interessanter Zelltyp identifiziert werden (Abb. 30). Dieser zeichnet sich durch die Anwesenheit von MPOs mit hoher Amplitude aber ohne Resonanz aus. Dieser Interneurontyp ($n = 6$) besaß einen mittleren Membranwiderstand ($310.4 \pm 96.3 \text{ M}\Omega$), eine hohe mAHP-Amplitude ($16.6 \pm 2.5 \text{ mV}$), eine relativ geringe SAG-Ratio (0.88 ± 0.04) und ein deutliches *Cluster*-Verhalten. Das RMP ($-59.8 \pm 3.1 \text{ mV}$) und die Membranzeitkonstante ($11.8 \pm 1.6 \text{ ms}$) war mit Sternzellen vergleichbar. Interessanterweise nahm die Frequenz von MPOs mit ansteigender Depolarisation zu. Die Frequenz der MPOs betrug $3.7 \pm 0.5 \text{ Hz}$ ($n = 3$) bei $\sim -46 \text{ mV}$ und bei $\sim -30 \text{ mV}$ lag die mittlere Frequenz bei $11.0 \pm 0.6 \text{ Hz}$ ($n = 3$). Obwohl resonante Pyramidenzellen in der Schicht II im Vergleich zu Sternzellen eine geringe SAG-Amplitude zeigten, konnte in diesem Zelltyp kein Resonanzverhalten an allen drei untersuchten Membranpotentialen beobachtet werden.

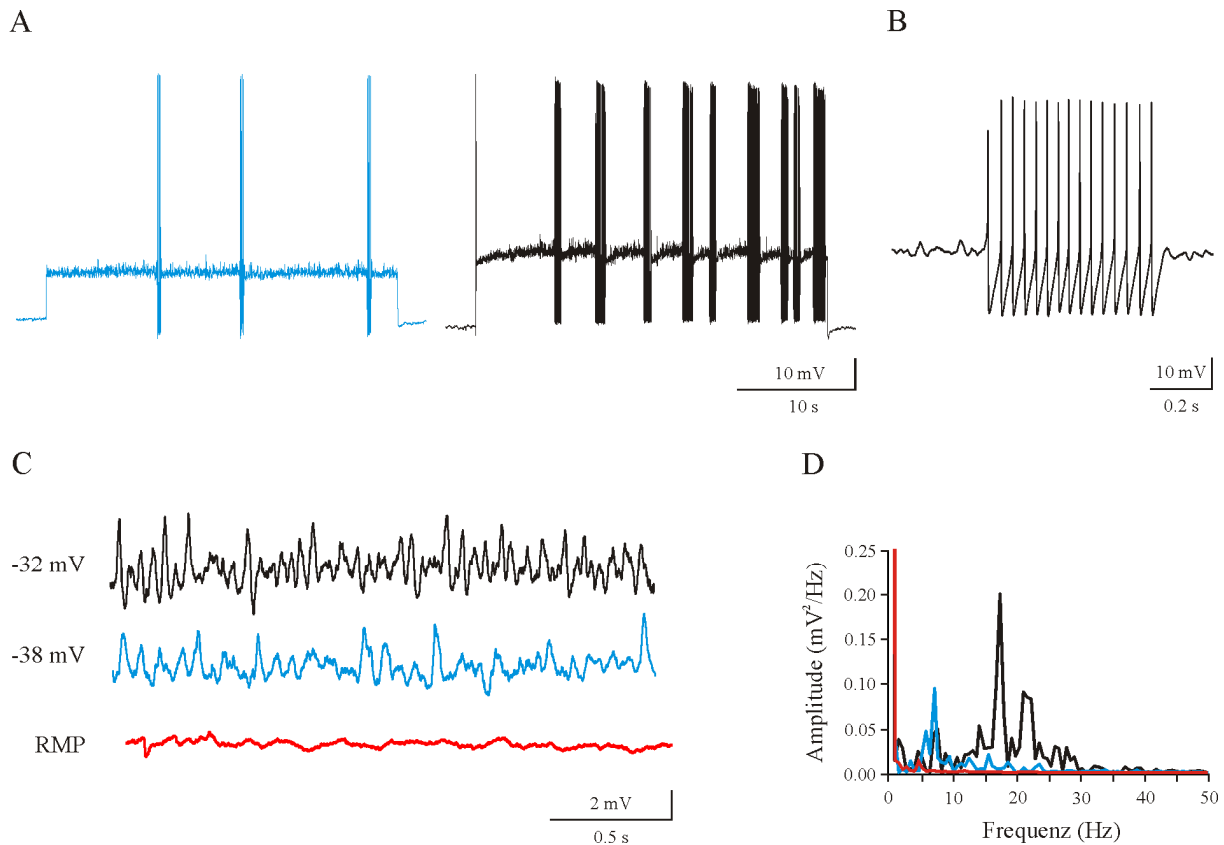


Abbildung 30: Neuron in der Schicht II des mEC. Dieser Zelltyp weist MPOs auf, deren Frequenz und Amplitude bei Depolarisation zunehmen. A) Spannungsantworten eines individuellen Neurons auf eine 30 s lange depolarisierende Strominjektion. B) Vergrößerte Darstellung eines AP-Clusters aus A. C) Vergrößerte Darstellung von Bereichen zwischen den Clustern und am RMP (rot). D) Die dazugehörige Spektralanalyse der Beispiele aus C zeigt eine deutliche Frequenzspitze um 15-20 Hz bei Depolarisation.

3.4.2 Resonante Interneurone im *Stratum radiatum* der CA1 Region

Feldpotentialoszillationen im γ -Frequenzbereich (30-100 Hz) wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet. Diese γ -Oszillationen repräsentieren eine Netzwerkaktivität, von der man ausgeht, dass sie einen essenziellen Beitrag zur neuronalen Informationsweiterleitung zwischen verschiedenen Hirnarealen leistet. *In vivo* wurde innerhalb des Hippokampus gezeigt, dass eine repetitive Stimulation schnelle γ -Oszillationen induzieren kann, welche sich vom DG zur CA3 und CA1 Region aber möglicherweise auch direkt vom DG zur CA1 Region ausbreiten. Um zu bestimmen, welche Neuronen- und Interneurontypen diese direkte Überleitung unter Umgehung der CA3 Region gewährleisten, wurde Dextranamin in die Zellschicht des DG eingebracht. Dadurch können direkte Verbindungen zwischen DG und CA1 Region dargestellt werden (siehe auch Material und Methoden). Es konnten resonante ($n = 11$) und nicht-resonante Zellen ($n = 13$) unterschieden werden, wobei auf letztere nicht weiter eingegangen werden soll. Innerhalb der resonanten Zellen konnte eine weitere Untergruppe von Zellen identifiziert werden, die Resonanz an einem depolarisiertem Membranpotential besonders stark ausbildeten (Abb. 31; $n = 8$).

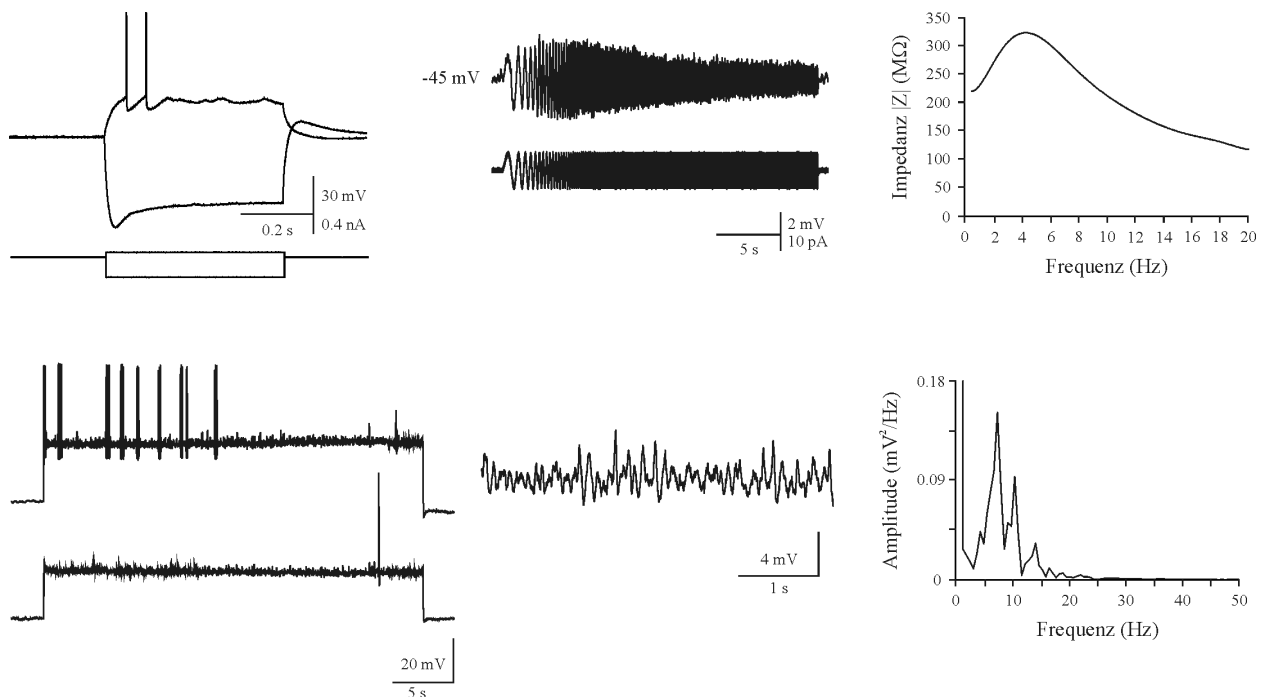


Abbildung 31: Dextranamin-positives Neuron Typ I nach DG-Injektion im *Stratum radiatum*. Dieser Zelltyp zeigt ein SAG-Potential, Resonanz im θ -Bereich, ein charakteristisches Entladungsverhalten als auch MPOs.

Innerhalb der resonanten Zellen, kam eine zweite Gruppe deutlich seltener vor (Abb. 32; $n = 3$) und zeigte besonders deutliche Resonanz an einem hyperpolarisierten Membranpotential. Die

3. Ergebnisse

zweite Subgruppe befand sich eher in der Mitte des *Stratum radiatum* der CA1 Region, wohingegen sich die zuvor beschriebene Untergruppe eher an der Grenze des *Stratum radiatum* zum *Stratum lacunosum moleculare* lag.

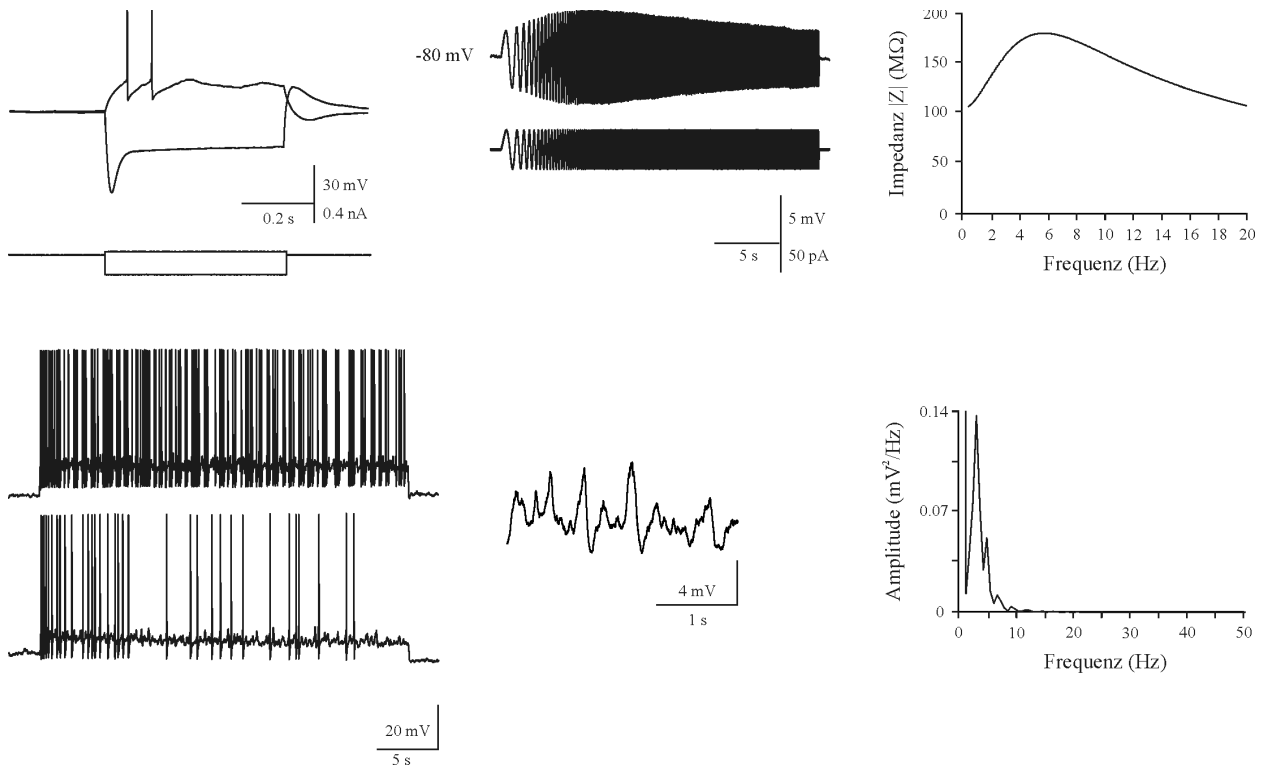


Abbildung 32: Dextranamin-positives Neuron Typ II nach DG-Injektion im *Stratum radiatum*. Dieser Zelltyp zeigt ein SAG-Potential, Resonanz als auch MPOs im θ -Bereich.

Die Zusammenfassung in Tabelle 4 verdeutlicht, dass sich diese beiden angefärbten Interneurone nicht nur in ihrem Resonanzverhalten unterscheiden, sondern auch in anderen wesentlichen Zelleigenschaften wie Membranwiderstand und RMP.

Dies zeigt, dass Interneurone der CA1-Region, die direkt mit dem DG in Verbindung stehen, resonant sein können. Die genaue Zuordnung des Zelltyps wird auch hier die immunhistologische Aufbereitung erfordern (Klausberger & Somogyi, 2008). Dessen ungeachtet ist dies die erste Beschreibung einer direkten resonanten Verbindung zwischen der CA1 Region und dem DG, die θ -Netzwerkoszillationen im DG und in der CA1 Region koppeln könnte.

Zelleigenschaft	Interneuron Typ I (n)	Interneuron Typ II (n)
RMP (mV)	-65.5 ± 1.7 (8)	-52.5 ± 0.6 (3)
R_{input} (M Ω)	441.5 ± 68.2 (8)	177.1 ± 59.2 (3)
Tau (ms)	14.9 ± 1.4 (8)	11.6 ± 2.5 (3)
V_{th} (mV)	-37.7 ± 1.4 (8)	-38.0 ± 4.1 (3)
Rheobase (pA)	51.3 ± 5.5 (8)	70.0 ± 11.6 (3)
MPO-Frequenz (Hz)	3.9 ± 0.9 (6)	2.6 ± 0.2 (3)
Res-Depo (Hz)/Q-Faktor	3.7 ± 0.3 / 1.35 ± 0.08 (5)	nicht detektiert
Res-RMP (Hz)/Q-Faktor	nicht detektiert	nicht detektiert
Res-Hyper (Hz)/Q-Faktor	2.6 ± 0.5 / 1.14 ± 0.04 (4)	5.8 ± 1.4 / 1.64 ± 0.25 (3)

Tabelle 4: Zusammenfassung der Zelleigenschaften von Dextranamin-positiven Zellen nach Injektion in den DG.

3.5 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES M-KANAL-MODULATORS ICA IM HIPPOKAMPUS

Eine bereits besprochenen Leitfähigkeit, die nicht nur die Resonanz sondern eine Vielzahl zellulärer Eigenschaften wesentlich beeinflusst, ist der I_M (Hu et al., 2002; Shah et al., 2008). Er bestimmt unter anderem in hohem Maße das Entladungsverhalten von Neuronen und beeinflusst so die Informationsweiterleitung im Hippokampus. Hier sollte getestet werden, inwieweit die Verstärkung des I_M die hier interessierenden Zelleigenschaften modulieren kann. Die bisher verwendete Substanz Retigabin besitzt den Nachteil auch Natrium-, Calcium- und GABA-Rezeptorströme zu beeinflussen (Rundfeldt & Netzer, 2000; Otto et al., 2002). Es ist daher wünschenswert weitere Modulatoren des I_M zu identifizieren und zu charakterisieren. Daher wurde der bisher nicht beschriebene I_M -Aktivator ICA der Firma Elbion verwendet. Unter der Annahme, dass die Verstärkung des I_M die Erregbarkeit von Neuronen reduziert, sollte zunächst getestet werden, ob diese neue Substanz epileptische Entladungen unterdrücken kann.

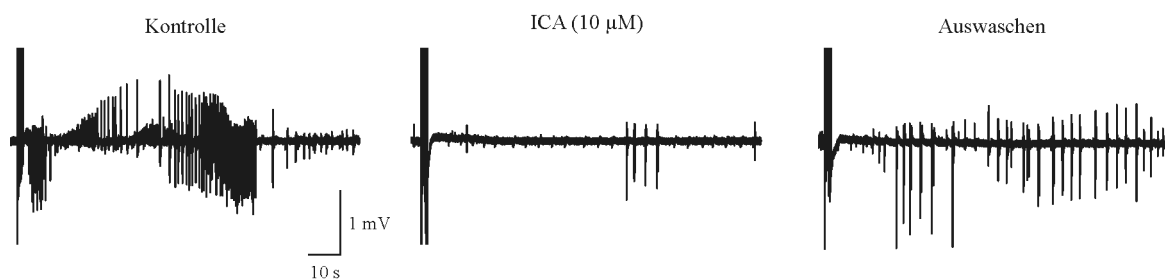
3.5.1 Die Wirkung von ICA auf epileptiforme Aktivität

Um die Eignung von ICA als Antikonvulsivum zu überprüfen, wurden extrazelluläre Feldpotentialableitungen in der CA1 Region und im mEC Schicht II in einen etablierten *in vitro* Modell für krampfähnliche Aktivität (*Seizure-Like Activity*) durchgeführt. In diesem Modell (Anderson et al., 1986) wird Magnesium aus der Perfusionslösung entfernt, wodurch der spannungsabhängige Block des N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptors reduziert und dadurch der erregende Effekt von endogenem Glutamat potenziert wird (Walther et al., 1986; Sah et al., 1989). Darüber hinaus verändern sich die neuronale Erregbarkeit und die

3. Ergebnisse

Freisetzungswahrscheinlichkeit präsynaptischer Terminalen. Diese Vorgehensweise resultiert in spontanen und synchronen, salvenartige Entladungen einer neuronalen Population (*Populations Bursts*) in der CA1 Region, was einem interiktalen Aktivitätsmuster ähnelt. Durch Stimulussalven in einem Intervall von 10 min wurden die Schaffer-Kollateralen und Kommissurfasern im *Stratum radiatum* im Bereich der hippocampalen CA1 Region aktiviert, um dadurch epileptiforme Nachentladungen im Hirnschnitt auszulösen, welche aus einer initialen tonischen und nachfolgenden klonischen Phase bestehen und bis zu 60 s andauern können. Das Einwaschen von 10 μM ICA über 60 min unterdrückte die epileptiformen Entladungen, sowohl im Bereich der CA1 Region als auch in der Schicht II des mEC vollständig (Abb. 33; n = 5).

Hippokampus CA1



Entorhinalkortex Schicht II

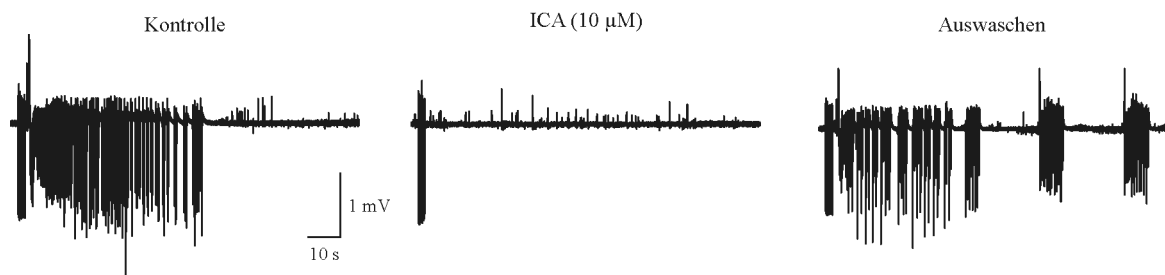


Abbildung 33: ICA blockiert epileptiforme Aktivität im Hippokampus und mEC. Die epileptiforme Aktivität wurde durch 0 mM MgSO_4 -ACSF und durch zusätzlicher elektrischer Stimulation der Schaffer-Kollateralen ausgelöst. Der Stimulus wurde alle 10 min mit einer Frequenz von 60 Hz über 2 s gegeben. Die Stimulusintensität entsprach 70 % der maximalen Antwort in der CA1 Region. Der blockierende Effekt auf die epileptiforme Aktivität von ICA (10 μM) nach 60 min war reversibel nach 90 min Auswaschzeit.

Die Suppression war reversibel und die epileptiformen Entladungen kehrten nach ungefähr 90 min Auswaschzeit zurück. Die Dauer der epileptiformen Ereignisse betrug in der Kontrolle in der CA1 Region 62.5 ± 16.0 ms (n = 5) und nach einer Auswaschzeit von 90 min 104.8 ± 1.1 ms (n = 2). In der Schicht II des mEC betrug die mittlere Krampfdauer vor der Applikation von ICA

51.7 ± 9.8 ms (n = 5) und nach dem Auswaschen 33.6 ms (n = 1). ICA unterdrückte damit epileptiforme Entladungen, jedoch nicht über die Dauer seiner Anwesenheit hinaus. Diese Beobachtung passt zu einem akuten Einfluss von ICA auf die neuronale Erregbarkeit, was im Weiteren detaillierter untersucht wurde.

3.5.2 Die neuronale Erregbarkeit und das Resonanzverhalten unter ICA

Der Effekt auf die neuronale Erregbarkeit von CA1 Pyramidenzellen wurde unter Anwendung verschiedener experimenteller Protokolle im Stromklemm-Modus (*Current Clamp*) untersucht.

Zum einen wurde ein Rampenprotokoll verwendet, bei dem bis zu 600 pA über einen Zeitraum von 4 s (150 pA/s) in die Zelle injiziert wurde. Dies geschah sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Anwesenheit von 10 µM ICA nach eine Applikationszeit von 15 min (Abb. 34). M-Kanäle werden durch eine Depolarisation (Schwelle ~ -60 mV) aktiviert (Halliwell & Adams, 1982; Hu et al., 2002). Demzufolge kann eine verstärkte Aktivität dieser Kanäle während der Stromrampe erwartet werden, was eine Abweichung vom Spannungsanstieg in der Kontrolle zur Folge hat. Das Einwaschen von ICA verursachte eine Verschiebung des RMPs in hyperpolarisierender Richtung, während der Membranwiderstand signifikant abnahm. Nach Applikation von ICA war das Schwellenpotential für AP-Auslösung in die depolarisierte Richtung verschoben und auch die Rheobase war stark erhöht. Diese Befunde sind zusammengefasst in Abb. 34 und Tabelle 5.

Zum anderen wurden Ströme von -400 bis 400 pA in 10 pA Schritten über 500 ms induziert, um weitere Zelleigenschaften wie die Membranzeitkonstante, *SAG-Ratio* und AP-Anstiegszeit von CA1 Pyramidenzellen zu untersuchen, welche jedoch von ICA unbeeinflusst blieben. Im Gegensatz dazu konnten signifikante Veränderungen des ersten ausgelösten APs hinsichtlich Amplitude, Dauer sowie der AHP identifiziert werden.

Um eine mögliche Wirkung von ICA auf das intrinsische Resonanzverhalten von Pyramidenzellen zu untersuchen, wurde, wie bereits ausführlich beschrieben, ein ZAP-Strom injiziert. Die resultierende Spannungsantwort wurden vor und 15 min nach Applikation von ICA an drei verschiedenen Potentialen (depolarisiert, RMP, hyperpolarisiert) registriert. Bei Depolarisation (~ -53 mV) konnte keine eindeutige mittlere Resonanzfrequenz bestimmt werden. Die Resonanzfrequenz lag unter 1 Hz und der dimensionslose Qualitätsfaktor, der die Stärke der Resonanz beschreibt, lag nahe 1 (n = 7). Die mittlere Resonanzfrequenz am RMP betrug 3.2 ± 0.2 Hz und der Q-Faktor 1.12 ± 0.01 (n = 7). Bei einer Hyperpolarisation (~ -78 mV) konnte eine mittlere Resonanzfrequenz von 4.5 ± 0.2 Hz und ein Q-Faktor von 1.26 ± 0.02 (n = 7) ermittelt werden. In der Anwesenheit von ICA konnte unter diesen experimentellen

3. Ergebnisse

Bedingungen kein Effekt auf die Resonanzfrequenz als auch auf den Q-Faktor an allen drei Membranpotentialen beobachtet werden.

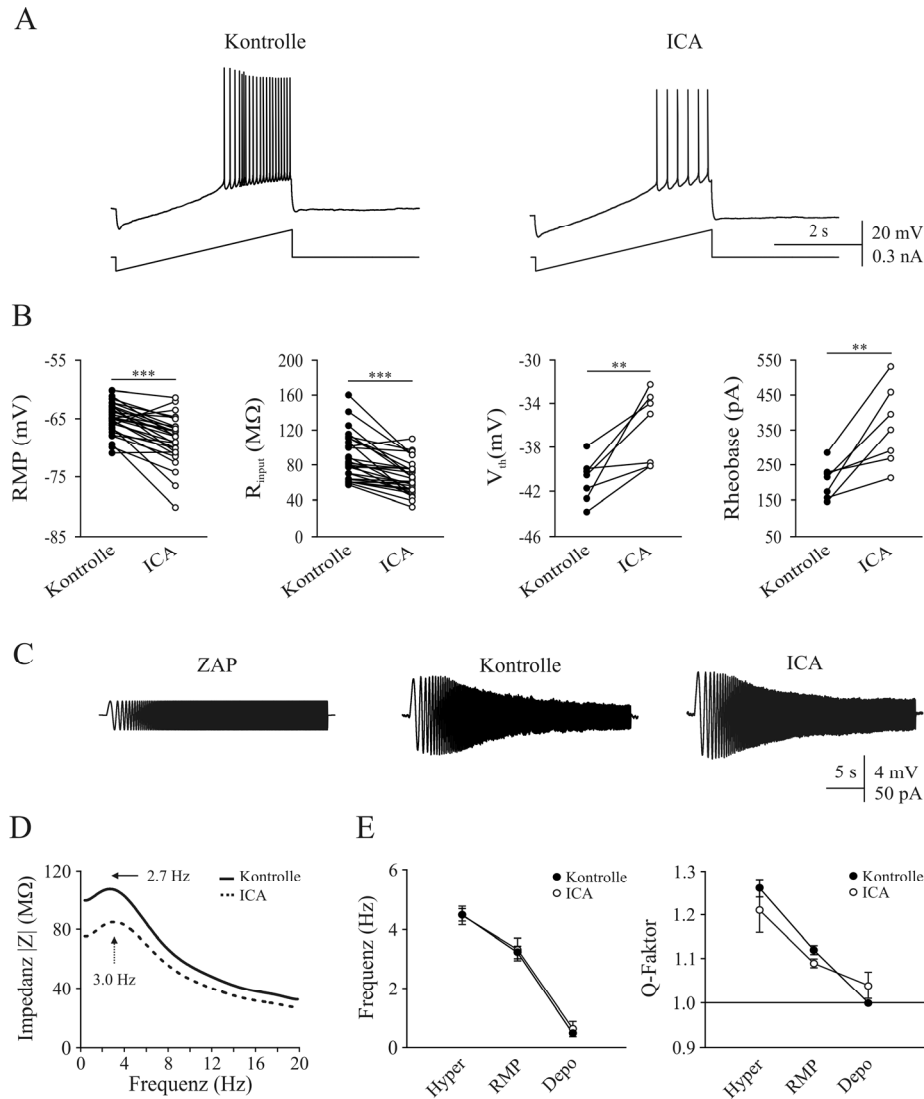


Abbildung 34: Wirkung von ICA auf intrinsische Zelleigenschaften von Pyramidenzellen in der CA1 Region. A) Repräsentative Aufnahmen einer typischen Spannungsantwort auf ein Stromrampen-Protokoll unter Kontrollbedingungen und unter Badapplikation von 10 μ M ICA. B) Darstellung des RMPs, der Membranwiderstandes (R_{input}), des Schwellenpotentials und der Rheobase individueller Pyramidenzellen vor und nach Badapplikation von ICA. C) Repräsentative Aufnahmen neuronaler Spannungsantworten auf eine sinusförmige Strominjektion mit konstanter Amplitude und linear ansteigender Frequenz (0-20 Hz) am Ruhemembranpotential. D) Resultierendes Impedanzprofil aus C. E) Quantitative Analyse der mittleren Resonanzfrequenz (links) und des Q-Faktors (rechts) an verschiedenen Membranpotentialen (Hyper: hyperpolarisiertes Potential; RMP: Ruhemembranpotential; Depo: depolarisiertes Potential). Der Asterik steht für den Grad der Signifikanzen (**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Das bedeutet, dass ICA die Erregbarkeit von CA1 Pyramidenzellen in einer Art verändert, die mit einer Modulation des I_M in Einklang steht, ohne jedoch die Resonanz signifikant zu verändern. Um zu überprüfen, ob die Unterdrückung epileptischer Aktivität ausschließlich auf

3. Ergebnisse

die reduzierte neuronale Erregbarkeit zurückzuführen ist, oder ob eventuell Effekte von ICA auf die synaptische Transmission eine Rolle spielen, wurde dies im Weiteren untersucht.

Zelleigenschaft	Kontrolle	ICA-110381	p (n)
R_{input} (M Ω)	88.9 \pm 5.1	66.4 \pm 3.6	< 0.001 (28)
RMP (mV)	-65.0 \pm 0.5	-68.6 \pm 0.8	< 0.001 (28)
Schwellenwert Rampe (mV)	-41.0 \pm 0.7	-36.2 \pm 1.2	< 0.01 (7)
Rheobase Rampe (pA)	205.7 \pm 18.4	358.8 \pm 42.0	< 0.01 (7)
Anzahl der APs (+ 400 pA)	10.0 \pm 0.8	0.9 \pm 0.5	< 0.001 (7)
AP-Amplitude (mV)	84.0 \pm 1.8	72.7 \pm 1.3	< 0.01 (7)
AP-Dauer (ms)	2.8 \pm 0.2	3.4 \pm 0.3	< 0.05 (7)
AP-Halbbreite (ms)	1.12 \pm 0.05	1.26 \pm 0.02	< 0.05 (7)
mAHP-Amplitude (mV)	-8.2 \pm 0.6	-12.8 \pm 0.9	< 0.001 (7)

Tabelle 5: Zusammenfassung der Zelleigenschaften von Pyramidenzellen der CA1 Region nach Badapplikation von ICA.

3.5.3 Der Einfluss von ICA auf postsynaptische Ströme

Um den potentiellen Effekt des I_M -Aktivators ICA auf die synaptische Übertragung an glutamatergen beziehungsweise GABAergen Synapsen zu charakterisieren, wurden postsynaptische Ströme in der Ganzzellkonfiguration registriert. Zur selektiven Registrierung der verschiedenen postsynaptischen Ströme wurden diese jeweils pharmakologisch isoliert. In Abbildung 35 sind Beispiele glutamaterger als auch GABAerger postsynaptischer Ströme hippokampaler CA1 Pyramidenzellen vor und nach Applikation des I_M -Aktivators ICA dargestellt. Zusätzlich wurde zwischen spontanen und sogenannten Miniaturströmen unterschieden und mittels TTX differenziert.

Postsynaptische Miniaturströme werden durch spontane Freisetzung einzelner Vesikel hervorgerufen, und bieten daher die Möglichkeit die Gesamtheit der funktionellen Synapsen eines Neurons zu untersuchen. Die Ganzzellableitungen im Spannungsklemm-Modus wurden bei einem Haltepotential von -70 mV und sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von TTX (1 μ M) durchgeführt. TTX verhindert durch spezifische Blockierung spannungsabhängiger Natriumkanäle die Entstehung spontaner Aktionspotentiale. Im Gegensatz zu glutamatergen postsynaptischen Strömen (EPSC) wurden inhibitorische GABAerge Ströme (IPSC) mit Cäsiumchlorid als Hauption der intrazellulären Pipettenlösung, einem Haltepotential von -70 mV und unter Blockade von Glutamaterezeptoren (AMPA-Rezeptoren; DNQX; 10 μ M) gemessen, da bei symmetrischen Chloridkonzentrationen das Chlorid-Gleichgewichtspotential theoretisch

3. Ergebnisse

näherungsweise bei 0 mV liegt und somit die IPSCs genügend groß für die Analyse sind. Die Analyse der unterschiedlichen postsynaptischen Ströme begrenzte sich auf die Frequenz und Amplitude der einzelnen Ereignisse unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von ICA in der Badlösung. Die EPSCs wurden nach Blockierung von GABA_A-Rezeptoren durch Bicucullin (5 μ M) registriert. Die mittlere Frequenz spontaner EPSCs (sEPSCs) von 3.4 ± 0.4 Hz unter Kontrollbedingungen blieb unter Applikation von ICA unverändert (3.4 ± 0.4 Hz; $n = 14$; $p = 0.91$; Abb. 35), wogegen die mittlere Frequenz der exzitatorischen Miniaturströme (mEPSCs) von 1.9 ± 0.4 Hz leicht aber nicht signifikant auf 2.0 ± 0.3 Hz nach Applikation von ICA ($n = 8$; $p = 0.47$; Abb. 35) anstieg. ICA hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Amplitude der sEPSCs (Kontrolle: -17.6 ± 0.9 pA; Effekt: -16.5 ± 1.0 pA; $p = 0.27$) sowie der mEPSCs (Kontrolle: -13.3 ± 1.1 pA; Effekt: -14.0 ± 1.5 pA; $p = 0.4$; Abb. 35).

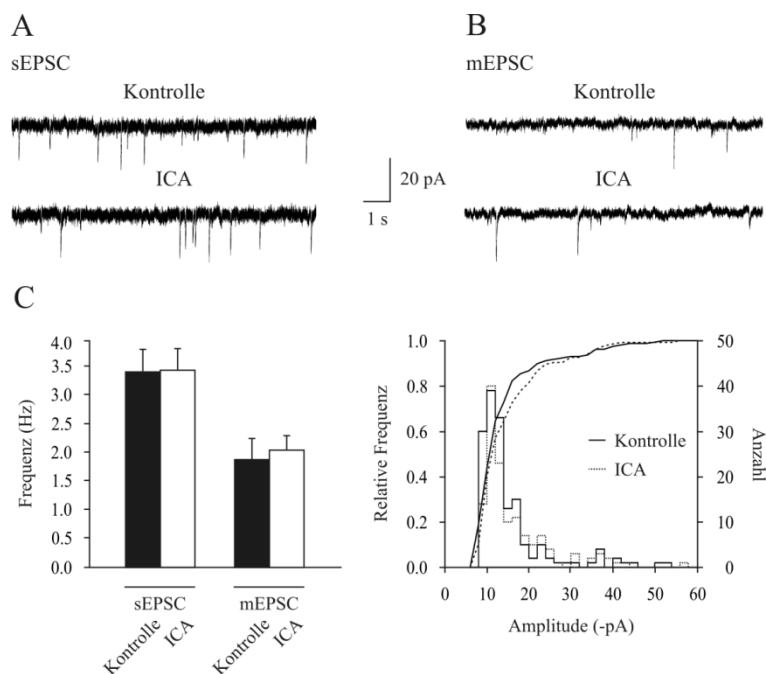


Abbildung 35: Eigenschaften von sEPSCs und mEPSCs von Pyramidenzellen in der CA1 Region. A+B) Repräsentative Aufnahmen von EPSCs in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 1 μ M TTX unter Kontrollbedingungen und nach 10 min Badapplikation von 10 μ M ICA. C) Zusammenfassende Darstellung der mittleren Frequenzen und individuellen Amplituden der sEPSCs und mEPSCs. Übereinandergelegte Linien zeigen die kumulativen Amplitudenhistogramme ($p > 0.05$; Kolmogorov-Smirnov Test).

Die mittlere Frequenz spontaner IPSCs (sIPSCs) von 9.2 ± 1.1 Hz und die mittlere Frequenz von 5.3 ± 0.8 Hz der inhibitorischen Miniaturströme (mIPSCs) blieben nach Applikation von ICA unverändert (sIPSCs: 9.6 ± 9.6 Hz; $n = 5$; $p = 0.64$; mIPSCs: 6.1 ± 0.8 Hz; $n = 10$; $p = 0.10$). Ähnlich wie für EPSCs beobachtet, unterschieden sich die mittleren Amplituden der sIPSCs und der mIPSCs in Anwesenheit von ICA (sIPSCs: -27.6 ± 0.2 pA; $p = 0.25$; mIPSCs: -23.7 ± 1.5

3. Ergebnisse

pA; $p = 0.22$) nicht signifikant von den Kontrollwerten (sIPSCs: -30.0 ± 1.6 pA; mIPSCs: -25.7 ± 2.0 pA; Abb. 36).

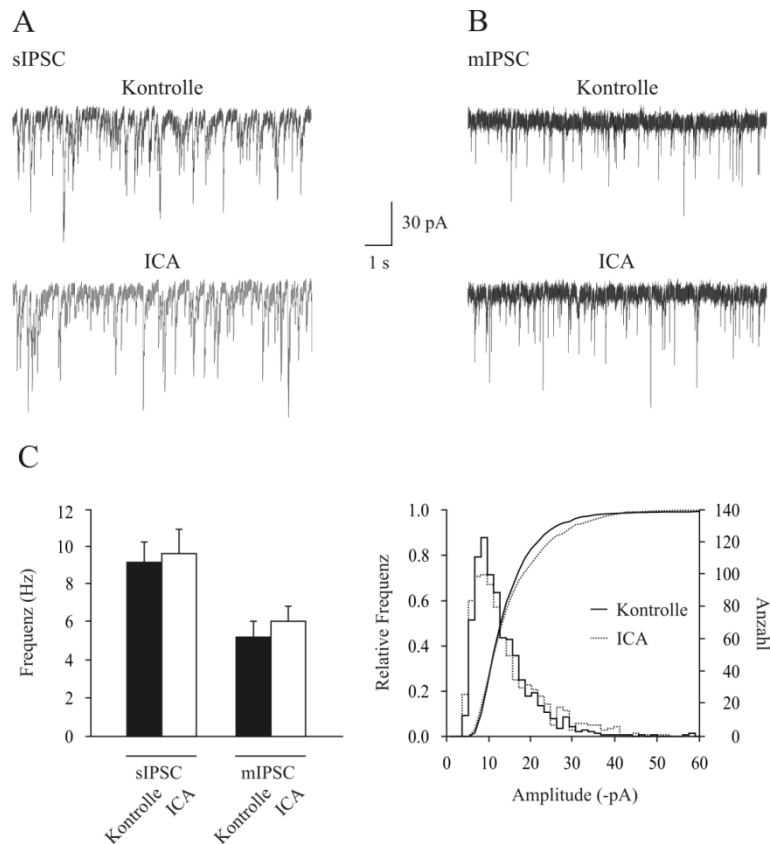


Abbildung 36: Eigenschaften von sIPSCs und mIPSCs von Pyramidenzellen in der CA1 Region. A+B) Repräsentative Aufnahmen von inhibitorischen postsynaptischen Strömen (IPSCs) in Ab- (A) und Anwesenheit (B) von 1 µM TTX unter Kontrollbedingungen und nach 10 min Badapplikation von 10 µM ICA. C) Zusammenfassende Darstellung der quantitativen Analyse der mittleren Frequenzen und individuellen Amplituden der IPSCs und mIPSCs unter Kontrollbedingungen und nach 10 min Badapplikation von 10 µM ICA. Übereinandergelegten Linien zeigen die kumulativen Amplitudenhistogramme ($p > 0.05$; Kolmogorov-Smirnov Test).

Zusammengefasst lässt sich also festhalten, dass ICA antikonvulsive Eigenschaften besitzt und die neuronale Erregbarkeit verändern kann, ohne die synaptische Übertragung auf der Ebene der quantalen Größe, der AP-unabhängigen und spontanen Wahrscheinlichkeit der Neurotransmitterfreisetzung zu verändern. Das könnte bedeuten, dass ICA unter Bedingungen relativ niedriger Netzwerkaktivität wenig Wirkung zeigt.

3.6 NETZWERKOSZILLATIONEN

Bisher wurden im Wesentlichen Oszillationen und Resonanzphänomene auf der Ebene einzelner Zellen untersucht und Leitfähigkeiten identifiziert, die diese blockieren oder verstärken können. Wenn Resonanz und/oder MPOs substantiell zu Netzwerkoszillationen beitragen, so sollte die

Modulation der identifizierten Leitfähigkeiten Netzwerkoszillation beeinflussen. Dies sollte im Weiteren getestet werden.

3.6.1 Pharmakologische Charakterisierung Kainat-induzierter Netzwerkoszillationen

Um den Einfluss verschiedener Ionenkanal-Leitfähigkeiten auf neuronale oszillatorische Netzwerkaktivität innerhalb des Hippokampus zu untersuchen, wurden 100 nM Kainat der Badlösung zugesetzt, was als etablierte Methode zur Induktion sowohl von Netzwerkoszillationen im γ -Frequenzbereich (γ -Oszillationen) in horizontalen Hirnschnitten als auch von Netzwerkoszillationen im θ -Frequenzbereich (θ -Oszillationen) in longitudinalen Hirnschnitten gilt (Gloveli et al., 2005a).

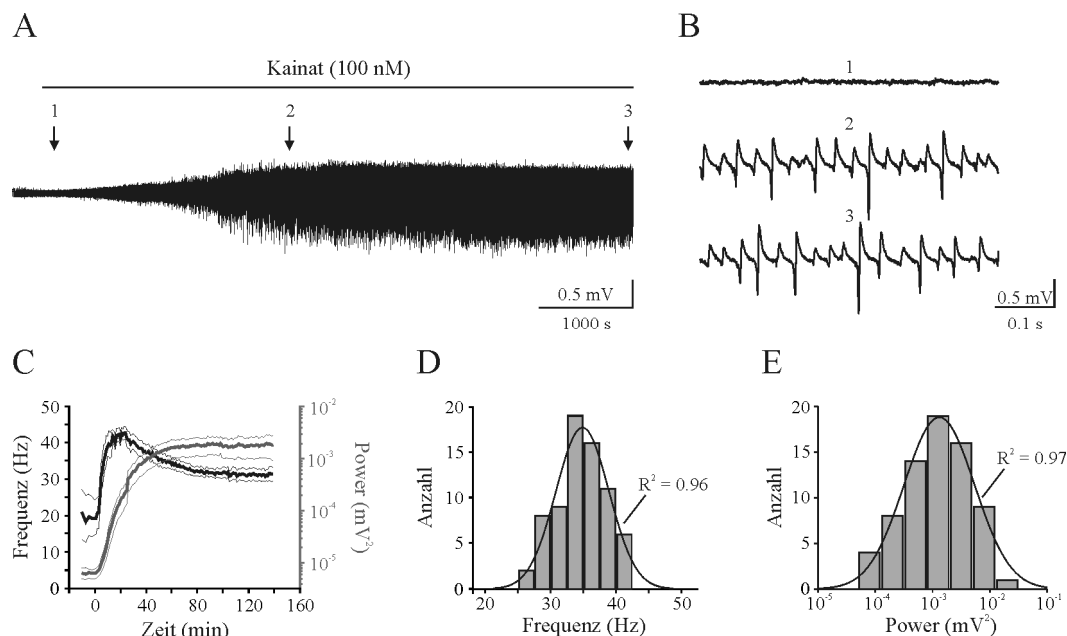


Abbildung 37: Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen in der CA3b Region im γ -Frequenzbereich. A) Repräsentative Ableitung in der Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*) der hippocampalen CA3b Region in horizontalen Hirnschnitten vor (1), während (2+3) insgesamt 120 min Kainatapplikation (100 nM). B) Vergrößerter Ausschnitt von den gekennzeichneten Bereichen 1 bis 3. C) Entwicklung der mittleren Oszillationsfrequenz (n = 9; schwarz; linke y-Achse) und der mittleren Oszillationspower (n = 9; grau; rechte y-Achse) während 100 nM Kainatapplikation. Die dünneren Linien geben die S.E.M. der jeweiligen Eigenschaft an. E) Amplitudenverteilung der Oszillationsfrequenz mit einer Anpassung nach Gauß (n = 71; links) und der Oszillationspower (n = 71, rechts) aller verwendeten Aufnahmen.

Die neuronale oszillatorische Netzwerkaktivität begann in den ersten 10-20 min nach Beginn der Kainat-Applikation und stabilisierte sich innerhalb von 60 min. Spektralanalysen belegen, dass pharmakologisch induzierte Netzwerkaktivität in der nachfolgenden Stunde, welche der Dauer der Applikation der zu untersuchenden Pharmaka entspricht, und darüber hinaus stabil blieb (Anstieg um 7.6 ± 6.6 %; n = 9; p = 0.30; Abb. 37).

Die Amplitude (*Peak to Peak Amplitude*) der induzierten γ -Oszillationen variierte von 0.4-2.0 mV in der CA3 Region (1.0 ± 0.1 ; $n = 24$) und von 0.2 - 0.5 (0.3 ± 0.2 ; $n = 25$) in der CA1 Region des Hippokampus. Die Spektralanalyse der Kainat-induzierten γ -Oszillationen zeigt eine mittlere Spitzenfrequenz von ~ 35 Hz (CA3: 34.5 ± 0.4 Hz; $n = 71$; CA1: 33.4 ± 0.6 Hz; $n = 47$) und in etwa 85 % der untersuchten Hirnschnitte bei der doppelten Durchschnittsfrequenz eine zweite harmonische Spitze und in etwa 30 % der Experimente eine dritte harmonische Spitze, bei der dreifachen Durchschnittsfrequenz. In hippocampalen Gehirnschnitten war die mittlere Power am höchsten in der CA3 Region mit $2.4 \pm 0.4 \cdot 10^{-3} \text{ mV}^2$, während die CA1 Region nur 14.6 % des Wertes der CA3 Region erreichte ($3.6 \pm 0.7 \cdot 10^{-4} \text{ mV}^2$). Um die Frequenzverteilung der Netzwerkoszillationen ermitteln zu können, wurde die Bandbreite bei halbmaximaler Power, die so genannte Halbbandbreite, bestimmt (siehe auch Abb. 12A). Sie gibt Aufschluss über die Synchronität der abgeleiteten Netzwerkoszillationen. Die mittlere Halbbandbreite betrug in der CA3 Region 9.8 ± 0.6 Hz und 10.6 ± 0.9 Hz in der CA1 Region. Die Latenz der γ -Oszillation zwischen der CA3 Region und der CA1 Region wurde mithilfe der Kreuzkorrelationsanalyse ermittelt (siehe auch Abb. 12B) und betrug 1.9 ± 0.1 ms ($n = 25$). Diese zeigt, dass sich die durch Kainat induzierten γ -Oszillationen aktiv von der CA3 Region in die CA1 Region ausbreiteten und es sich nicht um einen Fernfeldeffekt handelte. Der resultierende mittlere Koeffizient der Kreuzkorrelationsanalyse betrug 0.61 ± 0.02 . Die Amplitude der γ -Oszillationen war in *Stratum pyramidale* der CA3 Region am größten. Auf diesen Oszillationen saßen oft sogenannte *Spikelets* mit variabler Amplitude, welche mit zunehmenden Abstand zur Pyramidenzellschicht (*Stratum radiatum* oder *Stratum oriens*) seltener beobachtet wurden. Gleichzeitig durchgeführte, intrazelluläre Aufnahmen von Pyramidenzellen haben gezeigt, dass die Entladungsfrequenz von Pyramidenzellen gering ist und daher die Frequenz der *Spikelets* nicht Populationsantworten entspricht (Weiss et al., 2003; Wojtowicz et al., 2009). Sie repräsentieren demzufolge APs von unterschiedlichen Neuronentypen (zur Übersicht Somogyi & Klausberger, 2005). In einem weiteren experimentellen Ansatz, bei dem koronar angefertigte Hirnschnitte mit hauptsächlich longitudinaler Konnektivität Verwendung fanden, wurde durch eine Applikation von 100 nM Kainat eine oszillatorische Netzwerkaktivität im θ -Frequenzbereich (2-15 Hz) induziert. Hier wurde nur in der CA3 Region abgeleitet, da infolge der überwiegenden Trennung der CA3 Region von der CA1 Region in dieser speziellen Präparation der Hirnschnitte keine Ausbreitung der Netzwerkaktivität in die CA1 Region beobachtet werden konnte. Die mittlere Frequenz der θ -Oszillationen betrug 10.7 ± 0.7 Hz mit einer mittleren Power von $3.3 \pm 0.6 \cdot 10^{-5} \text{ mV}^2/\text{Hz}$ ($n = 26$) und waren allgemein weniger synchron als θ -Oszillationen *in vivo*. Die Amplitude der induzierten θ -Oszillationen variierte von 0.1-0.5 mV in der CA3 Region (0.25 ± 0.03 ; $n = 21$). In

Hirnschnitten mit horizontal-koronarer Orientierung konnten beide Frequenzbereiche – γ und θ – beobachtet werden. Diese Hirnschnitte wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.6.2 Die Wirkung von Retigabin auf Netzwerkoszillationen im Hippokampus

Retigabin (RTG, D-23129) gehört zu der Arzneimittelgruppe der Antikonvulsiva und verstärkt Kv7/KCNQ/M-Kanäle (Rundfeldt, 1997; Blackburn-Munro et al., 2005; Dalby-Brown et al., 2006) durch die Verschiebung der Aktivierungskurve in hyperpolarisierender Richtung und durch die Reduzierung der Deaktivierung (Tatulian et al., 2001).

RTG wurde in den Konzentrationen 250 nM, 500 nM und 1 μ M appliziert. Ein typisches Beispiel, welches in der CA3 Region und in der CA1 Region abgeleitet wurde (500 nM), ist in Abb. 38 dargestellt. Die Spektralanalyse ergab eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme der Netzwerkoszillationen nach 60 min Wirkstoffapplikation (Abb. 38), wie aus dem entsprechenden Zeitverlauf des Effektes von RTG auf γ -Oszillationen in den Regionen CA3 und CA1 zu erkennen ist (Abb. 38). Dieser Effekt war nicht reversibel, selbst nach einer Auswaschzeit von bis zu 6 Stunden (nicht gezeigt). In Abbildung 38 ist die dosisabhängige Modulation von RTG auf die Kainat-induzierten γ -Oszillationen illustriert. Interessanterweise konnte eine transiente Zunahme der Power innerhalb der ersten 30 min Applikationszeit bei allen Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 38D1 für 250 nM). Die Power reduzierte sich nach 60 min bei den Konzentrationen 500 nM und 1 μ M, jedoch nicht bei der geringeren Konzentration von 250 nM. Die Frequenz blieb dagegen nahezu stabil (Abb. 38D2). Bei 250 nM Retigabin war die Power nicht signifikant von der Kontrolle verschieden. Dagegen war sie deutlich in der CA3 Region bei 500 nM um 38.9 ± 7.0 % ($p < 0.001$) reduziert und in der CA1 Region um 29.9 ± 7.0 %. Die γ -Oszillationen waren bei 1 μ M vollständig in beiden Regionen blockiert (in der CA3 Region um 79.8 ± 9.9 % und in der CA1 Region um 68.6 ± 12.5 % reduziert). Die Oszillationsfrequenz bei 250 nM nahm in der CA3 Region ab (von 36.5 ± 1.3 Hz nach 34.2 ± 1.1 Hz; $n = 7$; $p < 0.05$) und blieb in der CA1 Region auch bei einer Konzentration von 500 nM unverändert. Bei höheren Konzentrationen nahm die Frequenz nach Applikation sowohl in der CA3 Region (von 36.4 ± 1.3 nach 32.4 ± 0.9 Hz; $n = 7$; $p < 0.01$) als auch in der CA1 Region (von 35.0 ± 1.4 Hz to 26.4 ± 2.2 Hz; $n = 5$; $p < 0.05$) signifikant ab. Die Halbbandbreite war dosisabhängig erhöht. Während die Halbbandbreite bei 250 nM noch unverändert war, stieg sie mit der Konzentration von RTG an. Bei 500 nM um 68.8 ± 25.5 % in der CA3 Region ($p < 0.05$) und um 142.6 ± 31.8 % in der CA1 Region ($p < 0.05$) und bei 1 μ M um 195.3 ± 68.2 % ($p < 0.05$) in der CA3 Region und um 209.1 ± 147.2 ($p = 0.23$) in CA1 Region.

3. Ergebnisse

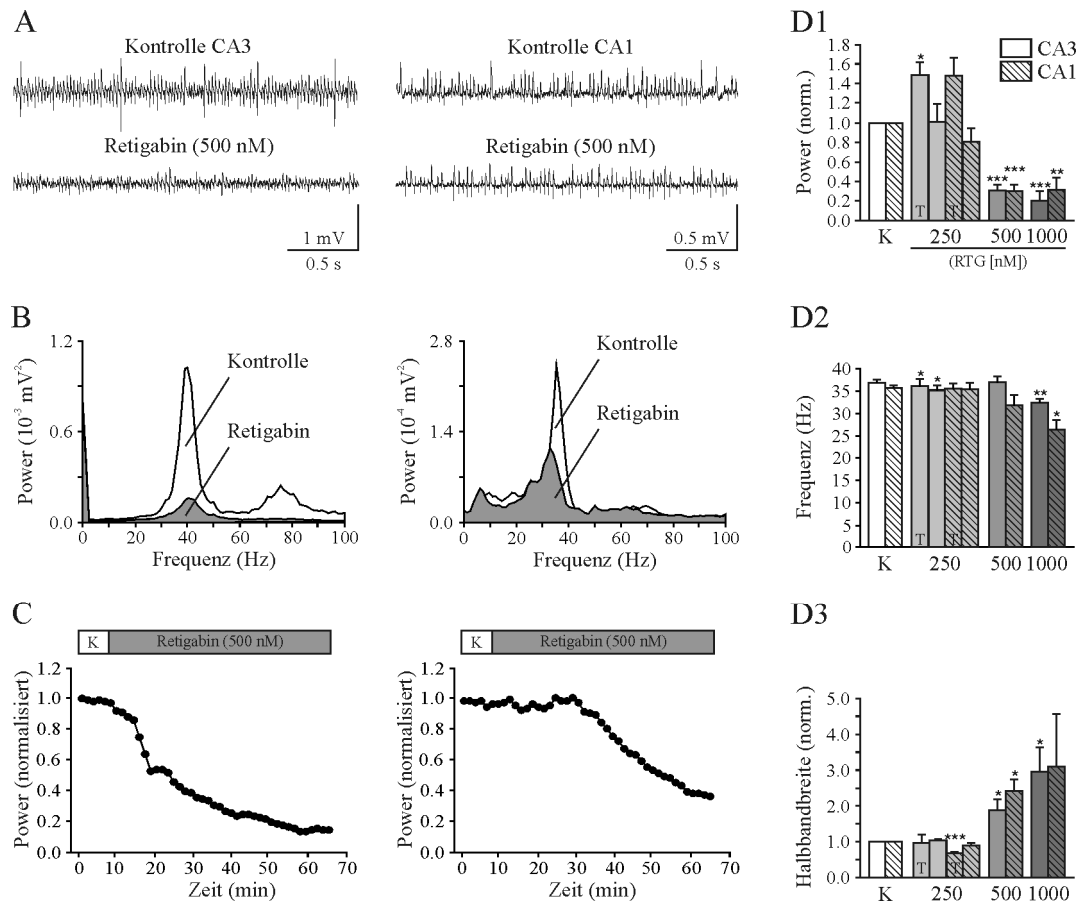


Abbildung 38: Kainat-induzierte γ -Oszillationen werden in horizontalen Hirnschnitten durch RTG blockiert. A) Repräsentative Ableitung von der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3 Region (links) und CA1 Region (rechts) unter Kontrollbedingung (oben) und nach 60 min Badapplikation von 500 nM Retigabin (RTG, unten). B) Power-Spektren der in (A) gezeigten Ableitungen vor (weiß) und nach Badapplikation von 500 nM RTG (grau). C) Veränderung der Power während der Badapplikation von RTG. (D) Balkendiagramme fassen die Quantifizierung der Power (D1), der Frequenz (D2) und der Halbbandbreite (D3) der Netzwerkoszillationen in der Regionen CA3 Region (n = 25) und der CA1 Region (n = 15; gestreift) für die verschiedenen Konzentrationen von RTG (CA3; 250 nM: n = 7; 500 nM: n = 11; 1000 nM: n = 7 und für CA1; 250 nM: n = 5; 500 nM: n = 5; 1000 nM: n = 5) zusammen. Die transiente Powererhöhung ist durch ein T markiert und der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

In weiteren Experimenten untersuchten wir die Wirkung von RTG (250 nM und 500 nM) auf Kainat-induzierten θ -Oszillationen in koronaren Hirnschnitten (Abb. 39). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige und signifikante Abnahme der Power der Netzwerkoszillationen. Bei einer Konzentration von 250 nM Retigabin reduzierte sich die Power um $22.9 \pm 7.2 \%$ (n = 5; $p < 0.05$) und um $54.0 \pm 11.2 \%$ (n = 5; $p < 0.001$) bei 500 nM (Abb. 39D1). Ab einer Konzentration von 500 nM ergab sich eine signifikante Verschiebung der Frequenz in geringere Frequenzbereiche bei gleichzeitigem, aber geringem Anstieg der Halbbandbreite (bei 250 nM von $12.2 \pm 1.4 \text{ Hz}$ auf $10.5 \pm 1.4 \text{ Hz}$; $p = 0.06$ und bei 500 nM von $12.5 \pm 2.0 \text{ Hz}$ auf $10.5 \pm 1.9 \text{ Hz}$; $p < 0.01$; Abb. 39D2, D3). Die Halbbandbreite war in beiden Fällen nicht signifikant

verändert. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus den Ableitungen in horizontalen Hirnschnitten, konnte in koronaren Hirnschnitten keine transiente Zunahme der Power beobachtet werden.

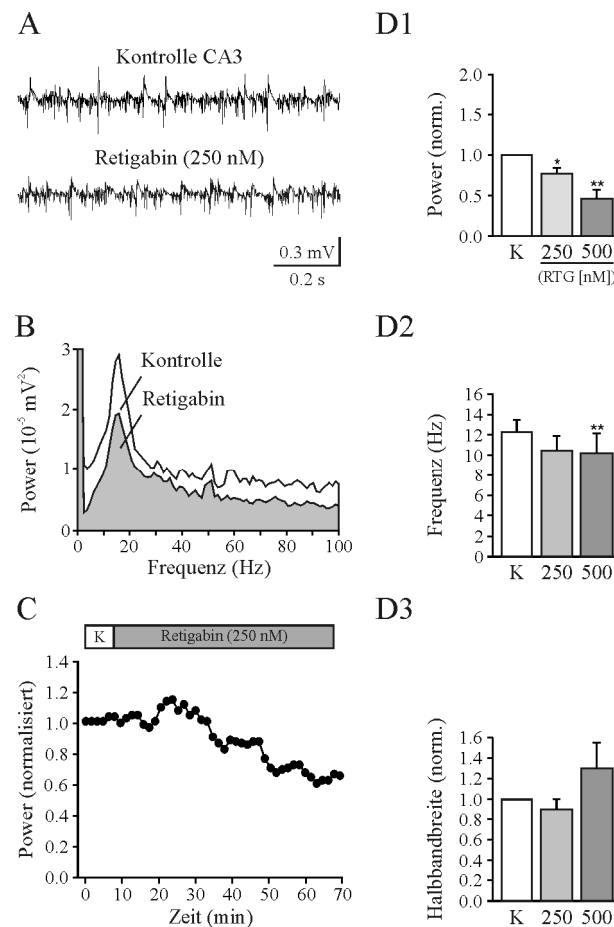


Abbildung 39: Kainat-induzierte θ -Oszillationen werden in koronaren Hirnschnitten durch RTG blockiert. A) Repräsentative Ableitung von der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3 Region (links) unter Kontrollbedingung (oben) und nach 60 min Badapplikation von 250 nM RTG (unten). B) Power-Spektren der in (A) gezeigten Ableitungen vor (weiß) und nach Badapplikation von 500 nM RTG (grau). C) Veränderung der Power während der Badapplikation von RTG. D) Balkendiagramme fassen die Quantifizierung der Power (D1), der Frequenz (D2) und der Halbbandbreite (D3) der Netzwerkoszillationen in der CA3 Region ($n = 10$) für die verschiedenen Konzentrationen von RTG (250 nM: $n = 5$; 500 nM: $n = 5$) zusammen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$).

3.6.3 Die Wirkung von ZD7288 auf Netzwerkoszillationen im Hippokampus

HCN-Kanäle ermöglichen oszillatorische Aktivität in thalamischen Neuronen (Lüthi & McCormick, 1998) und es wird angenommen, dass sie zum Resonanzverhalten und MPOs im EC und Hippokampus beitragen (Dickson et al., 2000; Nolan et al., 2004). ZD7288 ist ein Blocker von HCN-Kanälen und wird in einem breiten Konzentrationsspektrum (10-100 μM) in Hirnschnittexperimenten verwendet (Thoby-Brisson et al., 2000; Strauss et al., 2004; Gu et al., 2005; Aponte et al., 2006).

Die Wirkung von ZD7288 auf Kainat-induzierte γ -Oszillationen in horizontalen Hirnschnitten mit den Konzentrationen von 10, 20 und 50 μM in der Pyramidenzellschicht im Bereich der Regionen CA3 und CA1 ist in Abbildung 40 illustriert. Der blockierende Effekt von ZD7288 war nahezu irreversibel und eine partielle Erholung war nur in 2 Experimenten nach über 4 h Auswaschzeit zu beobachten (nicht gezeigt). Eine typische Ableitung unter Kontrollbedingungen und nach 60-minütiger Badapplikation von 20 μM ZD7288 ist in Abbildung 40A gezeigt. Die Spektralanalyse der gezeigten Ableitung in Abbildung 40A veranschaulicht die starke Unterdrückung der Netzwerkoszillationen (Abb. 40B) durch Applikation von ZD7288. Der zeitliche Verlauf des Effektes dieses einzelnen Experimentes ist in Abbildung 40C und die zusammenfassende Darstellung der quantitativen Analysen ist in Abbildung 40D1-3 gezeigt.

Bei einer Konzentration von 10 μM kam es zu einer persistenten Zunahme der Power in der CA3 Region, aber nicht in der CA1 Region. Bei höheren Konzentrationen wurde innerhalb der ersten 30 min nach Applikation von ZD7288 eine transiente Erhöhung der Power beobachtet. In der CA3 Region stieg bei 10 μM die Power nach 60 min um $86.7 \pm 21.6 \%$ ($n = 9$; $p < 0.01$), während die Halbbandbreite um $40.8 \pm 6.3 \%$ ($p < 0.001$) abnimmt. Im Vergleich nahm bei einer Applikation von ZD7288 in den Konzentrationen 20 und 50 μM die Power dosisabhängig signifikant um $67.3 \pm 7.7 \%$ ($n = 11$; $p < 0.001$) und $97.5 \pm 2.1 \%$ ($n = 5$; $p < 0.001$) ab, wobei bei 20 μM ZD7288 die Halbbandbreite um $57.47 \pm 21.96 \%$ ($p < 0.05$) anstieg, was auf eine Abnahme der Synchronität hindeutet. Bei allen hier verwendeten Konzentrationen verschob sich die Frequenz der Netzwerkoszillationen in Richtung niedriger β -Frequenzen (bei 10 μM von $32.3 \pm 1.2 \text{ Hz}$ nach $23.3 \pm 0.4 \text{ Hz}$; $p < 0.001$ und bei 20 μM von $33.9 \pm 1.4 \text{ Hz}$ nach $23.6 \pm 0.7 \text{ Hz}$; $p < 0.001$).

In der hippokampalen CA1 Region zeigten alle getesteten Konzentrationen von ZD7288 eine signifikante Abnahme der Power, obwohl die Badapplikation von 10 μM eine transiente Powerzunahme in 7 von 10 Hirnschnitten zeigte. Nach einer Applikationsdauer von 60 min des HCN-Kanalblockers zeigte sich jedoch insgesamt eine Reduktion der Power um $38.5 \pm 16.3 \%$ ($n = 10$; $p < 0.05$), bei 20 μM um $66.3 \pm 7.5 \%$ ($n = 7$; $p < 0.001$) und bei 50 μM um $92.4 \pm 6.2 \%$ ($n = 4$; $p < 0.001$). Die Oszillationsfrequenz verschob sich wie auch bei den Ableitungen in der CA3 Region in einen niedrigeren Frequenzbereich von $32.0 \pm 1.1 \text{ Hz}$ nach $22.9 \pm 0.4 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) bei 10 μM und von $31.9 \pm 1.9 \text{ Hz}$ nach $21.5 \pm 1.2 \text{ Hz}$ ($p < 0.01$) bei 20 μM . In der CA1 Region kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Halbbandbreite um $37.4 \pm 5.8 \%$ ($p < 0.001$) bei 10 μM , wogegen bei der Verwendung von 20 μM die Halbbandbreite nahezu unverändert blieb (Abb. 40D3).

3. Ergebnisse

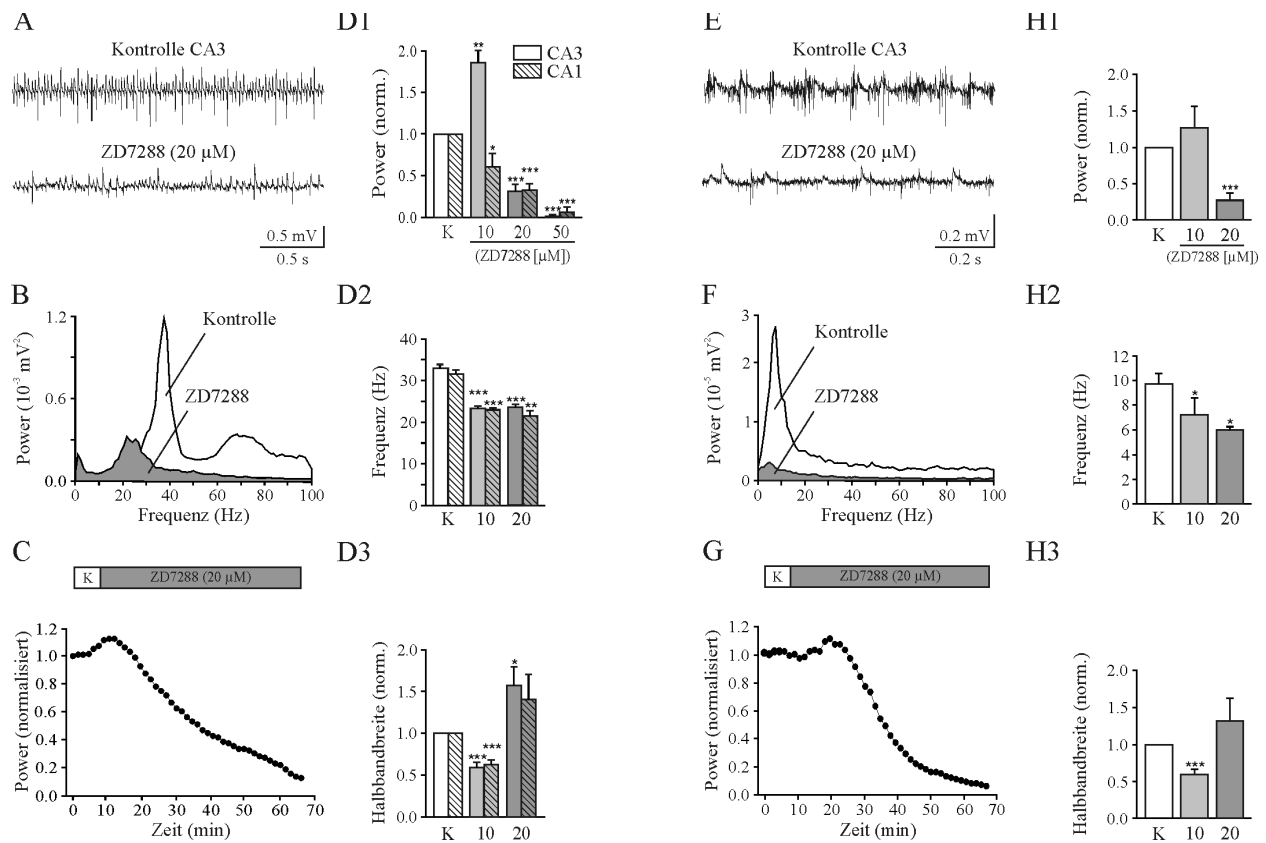


Abbildung 40: Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen werden durch ZD7288 blockiert. A) Repräsentative Ableitung von der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3 Region (links) in horizontalen Hirnschnitten unter Kontrollbedingung (oben) und nach 60 min Badapplikation von 20 µM ZD7288 (unten). B) Spektren der in (A) gezeigten Ableitungen vor (weiß) und nach Badapplikation von 20 µM ZD7288 (grau). C) Veränderung der Power während der Badapplikation von ZD7288. D) Balkendiagramme fassen die Quantifizierung der Power (D1), der Frequenz (D2) und der Halbbandbreite (D3) der Netzwerkoszillationen in der CA3 Region (n = 26) und der CA1 Region (n = 21) für die verschiedenen Konzentrationen von ZD7288 (CA3; 10 µM: n = 10; 20 µM: n = 11; 50 µM: n = 5 und für CA1; 10 µM: n = 10; 20 µM: n = 7; 50 µM: n = 4) zusammen. E) Repräsentative Ableitung der Pyramidenzellschicht der CA3 Region (links) in koronaren Hirnschnitten unter Kontrollbedingung (oben) und nach 60 min Badapplikation von 20 µM ZD7288 (unten). F) Power-Spektren der in (A) gezeigten Ableitungen vor (weiß) und nach Badapplikation von 20 µM ZD7288 (grau). G) Veränderung der Power während der Badapplikation von ZD7288. (H) Balkendiagramme fassen die Quantifizierung der Power (H1), der Frequenz (H2) und der Halbbandbreite (H3) der Netzwerkoszillationen in den Regionen CA3 für die verschiedenen Konzentrationen von ZD7288 (10 µM: n = 8; 20 µM: n = 8) zusammen. Der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$).

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung von ZD7288 (10 µM und 20 µM) auf Kainat-induzierte θ -Oszillationen in koronaren Hirnschnitten untersucht (jeweils $n = 8$; Abb. 40E-H). Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Power der Netzwerkoszillationen um $73.1 \pm 10.1 \%$ ($p < 0.05$) bei 20 µM ZD7288, wohingegen bei 10 µM die Power nahezu unverändert blieb. Im Gegensatz zu den γ -Oszillationen konnte während der θ -Oszillationen kein transienter Anstieg der Power beobachtet werden. Bei beiden verwendeten Konzentrationen verringerte sich die Frequenz der θ -Oszillationen signifikant (bei 10 µM von 10.1 ± 1.1 Hz nach 7.2 ± 1.4 Hz; $p <$

0.05 und bei 20 μM von $9.3 \pm 1.2 \text{ Hz}$ nach $6.0 \pm 0.3 \text{ Hz}$; $p < 0.05$), während die Halbbandbreite bei 10 μM ZD7288 um $40.6 \pm 6.7 \%$ ($p < 0.001$) signifikant abnahm und bei 20 μM ZD7288 beinahe unbeeinflusst blieb.

3.6.4 Die Wirkung von Losigamon auf Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen

Losigamon (AO-33) ist eine Substanz die ursprünglich als Antikonvulsivum entwickelt wurde. In verschiedenen Studien induzierte Losigamon eine stark reduzierte repetitive Entladungsfrequenz (Draguhn et al., 1997), eine moderate Reduktion der Amplitude exzitatorischer, postsynaptischer Potentiale (Schmitz et al., 1995), sowie eine ausgeprägte Depression des persistierender Natriumstroms (I_{NaP}) (Gebhardt et al., 2001). Aufgrund dieser, bereits bekannten Effekte stellte Losigamon eine geeignete Substanz dar, um die Beteiligung persistierender Natriumströme an Kainat-induzierten Netzwerkoszillationen zu untersuchen. Losigamon wurde in Konzentrationen von 100 μM und 200 μM für eine Dauer von 30 min appliziert. Eine typische Ableitung unter Kontrollbedingungen und Badapplikation von 100 μM Losigamon ist in Abbildung 41 gezeigt. Die Spektralanalyse der gezeigten Ableitung in Abbildung 41 veranschaulicht die starke Unterdrückung der Netzwerkoszillationen. Der zeitliche Verlauf des Effektes dieses einzelnen Experimentes und die zusammenfassende Darstellung der quantitativen Analysen ist in Abbildung 41 gezeigt.

In der CA3 Region verursachten alle getesteten Konzentrationen von Losigamon eine signifikante Abnahme der Power. Nach einer 30-minütigen Applikation von Losigamon zeigte sich eine dosisabhängige und signifikante Reduktion der Power. Diese betrug bei einer Konzentration von 100 μM Losigamon, $59.1 \pm 16.3 \%$ ($n = 7$; $p < 0.01$) und bei 200 μM $97.3 \pm 0.9 \%$ ($n = 5$; $p < 0.001$). Die Oszillationsfrequenz verschob sich in einen niedrigeren Frequenzbereich von $35.3 \pm 0.9 \text{ Hz}$ nach $22.2 \pm 4.2 \text{ Hz}$ ($p < 0.01$) bei 100 μM und von $31.6 \pm 0.7 \text{ Hz}$ auf $10.8 \pm 2.1 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) bei 200 μM . In der CA3 Region blieb die Halbbandbreite bei hoher Variabilität statistisch unverändert. Die Wirkung von Losigamon stellte sich in der hippokampalen CA1 Region ähnlich dar. Auch hier wurde bei allen getesteten Konzentrationen von Losigamon eine signifikante Abnahme der Power beobachtet: um $73.2 \pm 13.0 \%$ ($n = 7$; $p < 0.01$) bei 100 μM und um $82 \pm 10 \%$ ($n = 4$; $p < 0.01$) bei 200 μM . Die Oszillationsfrequenz verschob sich, wie auch bei den Ableitungen in der CA3 Region, in einen niedrigeren Frequenzbereich von $35.4 \pm 0.9 \text{ Hz}$ nach $17.0 \pm 2.6 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) bei 100 μM und von $31.0 \pm 0.7 \text{ Hz}$ nach $11.6 \pm 1.1 \text{ Hz}$ ($p < 0.001$) bei 200 μM . Auch hier blieb die Halbbandbreite statistisch unverändert. Die durch Losigamon herbeigeführte Unterdrückung von γ -Oszillationen war innerhalb einer Stunde nur teilweise reversibel.

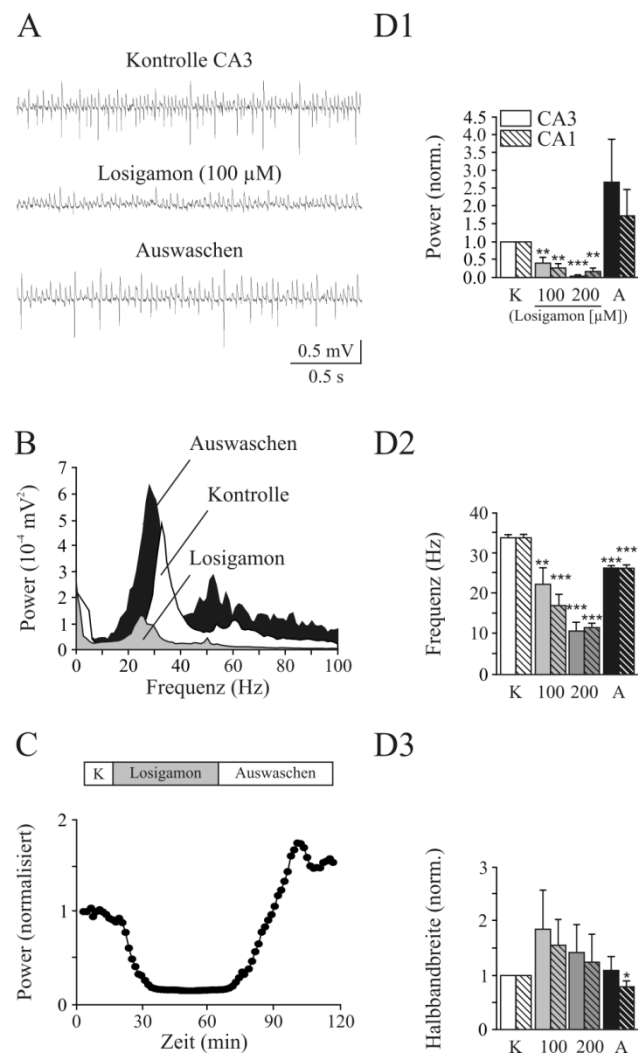


Abbildung 41: Kainat-induzierte γ -Oszillationen werden in horizontalen Hirnschnitten durch Losigamon reversibel blockiert. A) Repräsentative Ableitung von der Pyramidenzellschicht der hippocampalen CA3 Region unter Kontrollbedingung (oben) und nach 30 min Badapplikation von 100 μ M Losigamon (mittig) und Auswaschen (unten). B) Power-Spektren der in (A) gezeigten Ableitungen vor (weiß) und nach Badapplikation von 100 μ M Losigamon (grau) und Auswaschen (schwarz). C) Veränderung der Power während der Badapplikation von RTG. D) Balkendiagramme fassen die Quantifizierung der Power (D1), der Frequenz (D2) und der Halbbandbreite (D3) der Netzwerkoszillationen in den Regionen CA3 ($n = 12$) und CA1 ($n = 11$; gestreift) für die verschiedenen Konzentrationen von Losigamon und das Auswaschen (CA3; 100 μ M: $n = 7$; 200 μ M: $n = 5$; Auswaschen: $n = 9$ und für CA1; 100 μ M: $n = 7$; 200 μ M: $n = 4$; Auswaschen: $n = 8$) zusammen. Die transiente Powererhöhung ist durch ein T markiert und der Asterisk steht für den Grad der Signifikanz (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass alle hier verwendeten Pharmaka je nach Konzentration und studiertem Parameter Netzwerkoszillationen sowohl im γ - als auch im θ -Frequenzbereich unterdrücken können. Das bedeutet, dass dieselben Leitfähigkeiten, die für die Ausbildung von Resonanz und MPOs auf Einzelzellebene verantwortlich sind, auch für Netzwerkoszillationen benötigt werden.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde unter Verwendung von elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden die oszillatorische Aktivität in der hippocampalen Formation der Ratte *in vitro* untersucht. Dabei wurde zwischen der Einzelzell- und der Netzwerkebene unterschieden. Die wesentlichen Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden.

- Das Resonanzverhalten von Sternzellen in der Schicht II des mEC ist nicht nur topographisch organisiert, sondern zeigt deutliche, entwicklungsabhängige Unterschiede zwischen juvenilen (P20) und adulten Zellen (P46).
- MPOs und Resonanz sind dissoziierte Phänome. Letzteres benötigt in Sternzellen I_h und kann durch I_M moduliert werden. Der I_{NaP} spielt dabei eine untergeordnete Rolle.
- Das Resonanzverhalten in CA1 Pyramidenzellen wird ebenfalls nicht von I_M -Aktivatoren moduliert, obwohl diese Neurone einen deutlichen I_M aufweisen. Darüber hinaus zeigen auch individuelle Interneurone der CA1 Region ein deutliches Resonanzverhalten.
- Ungeachtet ihrer verschiedenen Beiträge zu Resonanz von einzelnen Neuronen sind alle drei Ströme (I_M , I_h und I_{NaP}) für die Aufrechterhaltung von Netzwerkoszillationen nötig.

4.1 STERNZELLEIGENSCHAFTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER POSITION

Eine Vielzahl von passiven und aktiven Eigenschaften von Sternzellen der Schicht II des mEC unterliegt einem dorso-ventralen Positionsgradienten, der sich teilweise bereits vor dem Zeitpunkt ausbildet, von dem an Ratten aktiv ihre Umgebung erkunden. Insbesondere der Gradient der Resonanz ist deutlich entwicklungsabhängig. Unter der Annahme, dass die Resonanzfrequenz mit der Gitterweite von Rasterzellen korreliert (Giocomo et al., 2007), könnte dies eine erfahrungsabhängige Verfeinerung eines genetisch determinierten, räumlichen Rasters darstellen. Weiterhin ist hervorzuheben, dass auch die zeitliche Präzision der AP-Entladung von Sternzellen sich in der Entwicklung erhöht, was ebenfalls die Kodierung räumlicher Positionen optimieren könnte.

Letztendlich sind die größten Veränderungen in den frequenzabhängigen Eigenschaften und die höchsten Resonanzfrequenzen im dorsalen mEC zu finden. Die Frequenzdifferenz zwischen dorsalen und ventralen Sternzellen könnte auch auf eine unterschiedliche Beteiligung an den verschiedenen Rhythmen des mEC hindeuten. In Übereinstimmung mit Dolorfo & Amaral

(1998) und kürzlich erschienen anatomischen Daten (Kerr et al., 2007) ist der dorsale mEC in seiner räumlichen Funktion eher homogen. Der ventrale mEC dagegen beinhaltet einige laterale Banden, von denen jedoch nur ein Band mit der räumlichen Repräsentation in Verbindung gebracht wird. Es ist demzufolge auch denkbar, dass bestimmte Modalitäten in unterschiedlichem Maße Resonanz für ihre Repräsentation benötigen und der Resonanzgradient die topographische Organisation der Modalitäten im mEC widerspiegelt (Steffenach et al., 2005).

Die topographisch organisierte Projektion vom mEC in den Hippokampus entlang einer dorso-ventralen Achse stimmt mit der dorso-ventralen Achse des Hippokampus überein (Dolorfo & Amaral, 1998; Witter et al., 2000). Injektionen von Dextranamin in den dorsalen mEC führt zu einer anterograden Anfärbung des dorsalen Hippokampus (Fyhn et al., 2004). Dabei stellten sich insbesondere das *Stratum moleculare* des DG und des Subikulum und das *Stratum lacunosum moleculare* der CA3 und der CA1 Region deutlich dar. Bei ventraler Injektion kam es zur Anfärbung des ventralen Hippokampus, wobei sich die gleichen Unterregionen im Hippokampus wie bei der dorsalen Injektion darstellten. Räumliche Informationen im dorsalen mEC stammen eventuell aus der afferenten Zellpopulation des Postrhinalkortex und dem dorsalen Präsubikulums. Diese projizieren besonders stark zu den oberen Schichten des dorsalen mEC (van Haeften et al., 1997; Burwell, 2000). Im Hippokampus wurde bereits nachgewiesen, dass seine Funktionen einer dorso-ventralem Achse unterliegen (Moser & Moser, 1998). Daher ist Ähnliches für den mEC nicht auszuschließen. Es spricht also vieles dafür, dass der Informationsfluss in der hippokampalen Formation räumlich organisiert und nach Modalitäten geordnet ist. Sternzellen sitzen hier an einer Schlüsselstelle. Man könnte also vermuten, dass die topographische Organisation ihrer Zelleigenschaften entweder die Modalität oder aber die Genauigkeit der räumlichen Positionsinformationen widerspiegelt. Unabhängig davon kann man festhalten, dass das Resonanzverhalten von Sternzellen eine ähnliche Kartierung aufweist wie funktionelle Aspekte des mEC.

4.2 ENTWICKLUNGSABHÄNGIGKEIT VON STERNZELLEIGENSCHAFTEN

In vielen Hirnarealen sind neuronale Karten anzutreffen (zum Beispiel im visuellen System). Die hierfür notwendigen anatomischen Verbindungen bilden sich meist in frühen Entwicklungsstadien und zunächst erfahrungsunabhängig aus, um anschließend eventuell erfahrungsabhängig angepasst zu werden. Hier wurde gezeigt, dass sich Zelleigenschaften innerhalb einer solchen Karte im mEC noch lange nach dieser Phase verändern können und so möglicherweise die Kartierung erfahrungsabhängig optimieren. Tatsächlich zeigen Ratten erst ab einem Alter von drei bis vier Wochen ausgeprägtes exploratives Verhalten.

Am Ende der zweiten postnatalen Woche der Ratte ist die Mehrzahl der Zellen im mEC ausdifferenziert und die Spontanaktivität hat ein adultes Niveau erreicht (Burton et al., 2008). Im Gegensatz dazu ist die Entwicklung der synaptischen Verbindungen und der zellulären Eigenschaften noch nicht abgeschlossen. So steigt zum Beispiel die Dendritendichte von Sternzellen der Schicht II des mEC zwischen den postnatalen Tagen 14 (P14) und 26 beinahe dreifach an. Im Gegensatz dazu erreichen viele Ionenkanäle nach den ersten drei Lebenswochen ihre adulte Expressionsstärke. Darüber hinaus ist die spontane Aktivität einer juvenilen (P18), individuellen Sternzelle kaum von adulten Sternzellen zu unterscheiden (Burton et al., 2008). Es wurde hier jedoch gezeigt, dass trotz des Reifegrades, den Sternzellen in der dritten postnatalen Woche erreichen, ihre Eigenschaften (zum Beispiel Membranwiderstand, Resonanzfrequenz) sich noch drastisch verändern können. Das kann daran liegen, dass zwar die Expression sich nicht mehr ändert, aber die Verteilung der Kanäle dynamisch modifiziert wird, oder dass intrazelluläre Signalkaskaden die Aktivität der Kanäle verändern, und so die integrativen Funktionen und das Entladungsverhalten der Sternzelle anpassen.

Die Integration des zeitlichen Musters präsynaptischer neuronaler Aktivität benötigt einen integrierenden Mechanismus. Einen wesentlichen Bestandteil dieses Integrators stellen die passiven Eigenschaften der Zelle dar, welche grob durch die Membranzeitkonstante erfasst werden können. So hätte eine hohe Membranzeitkonstante zur Folge, dass die Membran nur langsam umgeladen werden kann, das Integrationsfenster lang ist und die Zelle als Tiefpassfilter fungieren kann. Die Membranzeitkonstante hängt direkt von der Zellkapazität – und damit von der Zellgröße – als auch vom Membranwiderstand ab. Sie ist in vielen unreifen und juvenilen Zellen relativ hoch. Die oben bereits erwähnten Veränderungen der Sternzellmorphologie hätten also deutlichen Einfluss auf die Membranzeitkonstante. Es ist daher denkbar, dass die hier beobachtete Entwicklung der passiven Sternzeleigenschaften auf Veränderungen der Morphologie oder auf das Muster oder die Modulation vorhandener Leitfähigkeiten zurückzuführen sind.

Unmittelbar mit integrativen Funktionen verbunden ist die hier untersuchte Resonanz. Ein Resonator hat den Vorteil, spezifischer auf das zeitliche Muster zu reagieren. Um einen biologischen Resonator zu erstellen, benötigt man eine symbiotische Aktivität von einer Vielzahl verschiedener Kalium- und HCN-Kanälen (Hutcheon & Yarom, 2000; Erchova et al., 2004; Fransen et al., 2004; Schreiber et al., 2009). Die Entwicklung der Expression und Verteilung der einzelnen Leitfähigkeiten ist von verblüffender Komplexität und nicht nur gekennzeichnet durch eine Fülle von Wechselwirkungen sondern auch durch die Aktivitätsabhängigkeit (Moody & Bosma, 2005). Die aktivitätsabhängige Umverteilung von für die Resonanz notwendigen

Kanälen in der Zelle könnte also die erfahrungsbedingte Ausbildung des Resonanzgradienten erklären.

MPOs zeigten hier ebenso wie Resonanz einen deutlichen Frequenzgradienten, der sich jedoch im Gegensatz zur Resonanz nicht in der Entwicklung änderte. Insbesondere I_{NaP} wurde eine besondere Rolle für MPOs zugewiesen. Dieser verdoppelt seine Expression von P14 bis P18 und erreicht P21 das adulte Niveau (Alonso & Llinás, 1989; Lampl & Yarom, 1997; Burton et al., 2008). Daher ist es nicht überraschend, dass in dem hier untersuchten Entwicklungsabschnitt nahezu keine Veränderungen in der Resonanzamplitude sowie in der Power der MPOs festgestellt wurden.

Das genaue Entwicklungsprofil des HCN-Kanals in Sternzellen ist weniger klar. Es ist jedoch bekannt, dass der I_h in der frühen postnatalen Entwicklung von Sternzellen zunimmt (Richter et al., 1997). Auch wurde gezeigt, dass in den ersten postnatalen Wochen die Expression von HCN1 zunimmt (Surges et al., 2006). Burton et al. (2008) konnten zeigen, dass die Expression der HCN-Kanäle am Ende der vierten postnatalen Wochen ohne deutliches elektrophysiologisches Korrelat weiter leicht zunimmt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne HCN-Untereinheiten differenziell exprimiert werden, unterschiedliche Expressionsgradienten zeigen und die Resonanz und das SAG-Potential verschieden stark bestimmen. Weiterhin ist unklar, ob Variationen in der Aktivierungskinetik (Giocomo & Hasselmo, 2008b) oder die Anzahl der HCN-Kanäle mit den gleichen Kinetiken der Entwicklung der topographischen Organisation zugrunde liegen. Interessant ist hier insbesondere die HCN1-Untereinheit (Notomi & Shigemoto, 2004), die durch ihre schnelle Aktivierung gekennzeichnet (Chen et al., 2001) und deren Rolle für Resonanz demonstriert worden ist (Nolan et al., 2007; Giocomo & Hasselmo, 2009). Ihre Expression ist möglicherweise wichtig für die Entstehung von funktionellen Unterschieden der neuronalen HCN-Kanäle (Franz et al., 2000). Dies könnte für die hier erhobenen Befunde bedeuten, dass ein Anstieg der dorsalen HCN1-Expression zu einem schnelleren SAG-Verlauf und einer höheren Resonanzfrequenz führt. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass HCN-Kanäle durch cAMP moduliert werden und HCN1 der am geringsten sensible ist (Santoro & Tibbs, 1999). Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration verschiebt beispielsweise in isolierten Schrittmacherzellen des Kaninchenherzens die Aktivierungskurve von HCN-Kanälen um ~ 10 mV in depolarisierender Richtung (DiFrancesco & Tortora, 1991). Auch unreife Sternzellen von 8-14 Tage alten Ratten weisen eine deutliche Verstärkung des I_h durch cAMP auf (Richter et al., 2000), was zu einer geringen Expression von HCN1 passen würde. Das bedeutet, dass entweder in juvenilen Tieren die intrazelluläre cAMP-Konzentration nicht ausreichend ist, um genügend I_h für Resonanz verfügbar zu halten, oder dass schnelle HCN-Untereinheiten wie HCN1 besser Resonanz unterstützen können als langsame. Im

ersten Szenario sollte die Aktivierung der Adenylatzyklase in jungen Tieren die Resonanz begünstigen. Dies wird in zukünftigen Experimenten zu klären sein.

In Übereinstimmung mit Burton et al. (2008) zeigte sich, dass resonante Zellen im mEC einen geringeren Membranwiderstand haben. Darüber hinaus korrelierte die Resonanzfrequenz mit dem Membranwiderstand. Einen Gegensatz dazu stellen die Interneurone im *Stratum radiatum* der CA1 Region dar. Sie besaßen einen – im Vergleich zu Sternzellen – vergleichsweise hohen Membranwiderstand, beim Typ II ein größeres SAG-Potential und eine ausgeprägtere Resonanz bei Hyperpolarisation. Daher ist der Membranwiderstand eher ein sekundärer Parameter und kann nur zum Vergleich innerhalb eines Neuronentyps herangezogen werden.

Die Entwicklung war auch durch eine ansteigende Amplitude und zunehmende Verkürzung der AHP charakterisiert. Darüber hinaus korrelierte die Dauer, aber nicht die Amplitude der AHP mit der Position und der Resonanzfrequenz. Das deutet darauf hin, dass entwicklungsbedingte Veränderungen von der AHP und der Resonanz einen gemeinsamen Nenner haben (zum Beispiel I_h). Weiterhin hängt die Halbbreite der APs von Position und dem Alter ab, was nahelegt, dass auch andere Kaliumkanäle ihre funktionelle Bedeutung für die Formung des APs verändern (zum Beispiel Ca^{2+} -abhängige; Gu et al., 2007).

4.3 PHARMAKOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER RESONANZ VON STERNZELLEN

Ziel war es, die wesentlichen Leitfähigkeiten zu identifizieren, die zur Resonanz beitragen, und zu klären, welche Rolle sie spielen. Die ins Auge gefassten Kandidaten waren I_M , I_h und I_{NaP} . Die Resonanzeigenschaften wie Frequenz und Q-Faktor in beiden Altersgruppen hängen besonders vom Membranpotential ab. Die Zunahme der Frequenz und des Q-Faktors mit Hyperpolarisation wurde teilweise bereits beschrieben (Nolan et al., 2007). Dieses weist auf ein HCN-vermitteltes Resonanzverhalten von Sternzellen im mEC hin, da I_h mit zunehmender Hyperpolarisation aktiviert/verstärkt wird. Im Gegensatz dazu stehen Messungen mit scharfen Mikroelektroden, in denen das Resonanzverhalten unabhängig vom Membranpotential war (Erchova et al., 2004). Das könnte damit erklärt werden, dass der dort untersuchte Membranpotentialbereich von nur 4-6 mV im Gegensatz zu den hier untersuchten 20 mV nicht ausreicht, um hinreichende Unterschiede der Aktivierung des I_h und damit der Resonanz zu erreichen. Weiterhin wurde in der letztgenannten Studie nicht beachtet, dass APs nicht nur durch das eigentliche AP sondern auch durch die folgende AHP die Spannungsantwort auf einen ZAP-Strom kontaminieren. Es wurde daher hier viel Wert darauf gelegt, dass das experimentelle Protokoll keine APs auslöste. Ein potenzielles Problem stellt das sogenannte „Auswaschen“ von Strömen in der Ganzellkonfiguration dar. Jedoch sind die Q-Faktoren, die mit scharfen Mikroelektroden und in

der Ganzzellkonfiguration ermittelt wurden, im Mittel nicht wesentlich verschieden (im Vergleich zu Erchova et al., 2004). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein bisher unbekannter Mechanismus existiert, der in der Ganzzellkonfiguration eine Spannungsabhängigkeit der Resonanz begünstigt.

Es ist also wahrscheinlich, dass I_h eine tragende Rolle für Resonanz spielt, während weitere Ströme diese modulieren. Insbesondere hinsichtlich der Kaliumströme existieren viele kontroverse Daten, was ihre Bedeutung für die Regulierung der Resonanzfrequenz, ihren Zusammenhang mit der MPO-Frequenz und *Cluster*-Frequenz betrifft. Basierend auf dem *Resonate-and-Fire* Modell (Engel et al., 2008) würde man MPO-Frequenzen erwarten, die kleiner als die Resonanzfrequenz am RMP ist, was hier im Wesentlichen der Fall war. Allerdings stimmen die Beobachtungen hinsichtlich der MPO-Frequenzen mit den Beobachtungen mit Alonso & Klink (1993) in Sternzellen insofern nicht überein, dass die MPO-Frequenz in dieser Studie und auch in einer Studie von tieferen Zellen im EC (Schmitz et al., 1998) mit zunehmender Depolarisation ansteigt. In den hier präsentierten Experimenten war die MPO-Frequenz stabil und lediglich die Power nahm mit Depolarisation zu, wie bereits für eine Untergruppe hippokampaler Neurone beschrieben (Bland et al., 2002). Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass verschiedene Mechanismen MPOs und Resonanz erzeugen, aber sich überlappenden Leitfähigkeiten bedienen. In diesem Hinblick ist es sehr interessant, dass ein Neuronentyp im mEC gefunden wurde, der bei deutlichen MPOs und hoher AHP-Amplitude keine Resonanz zeigte (Abb. 30). Dieses ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung. Erstens scheint damit klar, dass MPOs und Resonanz sich nicht notwendigerweise bedingen bzw. Voraussetzung füreinander sind. Zweitens, liegt die Vermutung nahe, dass nicht die mAHP-Amplitude, sondern ihre Dauer entscheidend für die Resonanz ist. Was die genaue Identität dieser Zellen betrifft, so kommen eine Reihe von Zelltypen in Betracht, deren genaue Zuordnung eine zukünftige immunhistologische Aufarbeitung erfordert.

4.3.1 Modulation der Sternzeleigenschaften durch den I_M

Effekte von I_M auf die intrinsische, neuronale Erregbarkeit wurden schon früh von Adam et al. (1982) studiert. In Zellen, die über das RMP hinaus depolarisiert werden, tragen diese Ionenkanäle zum mAHP bei (Gu et al., 2005). Jüngste Versuche an genetisch-veränderten Mäusen mit einem bedingt-ausgeschalteten KCNQ-Kanal (*Conditional Knock-Out* Mäuse) zeigten in CA1 Pyramidenzellen eine verminderte mAHP, gesteigerte Erregbarkeit, reduzierte AP-Frequenzanpassung, sowie abgeschwächte θ -resonante Zelleigenschaften (Peters et al., 2005). Jedoch ist wenig über den Einfluss des I_M auf Sternzellen der Schicht II des mEC bekannt, obwohl die Modulation der dynamischen Zelleigenschaften durch Veränderungen von

I_M für die Aktivität des mEC im Rahmen von Gedächtnisfunktionen wichtig erscheint. Die Aktivierung durch Muskarin verstärkt das Oszillationsverhalten in Sternzellen durch Depolarisation (Klink & Alonso, 1997b). Dadurch wird die Zelle auf ein Membranpotential gebracht, an dem unterschwellige MPOs entstehen und mit steigender Depolarisation in der Amplitude zunehmen. Die Frequenz dieser MPOs wird nur durch eine relativ hohe Konzentration von Carbachol (30 μ M) reduziert, was deutlich zeigt, dass der klassische I_M nicht essenziell für die Entstehung von unterschweligen MPOs ist (Klink & Alonso, 1997b). Sternzellen zeigten wenig Beeinflussung durch I_M -Modulation. Durch die Blockade von I_M durch XE991 wurde die mAHP-Halbbreite verlängert aber kein Effekt auf die Amplitude beobachtet. Dagegen bewirkte eine Verstärkung des I_M durch ICA einen Anstieg der mAHP-Amplitude jedoch keine Reduzierung der mAHP-Halbbreite. Da es zu keiner drastischen Veränderung der mAHPs kam, kann angenommen werden, dass entweder in Sternzellen die mAHP nicht weiter verstärkt werden kann oder im Wesentlichen nicht von I_M abhängt. Zu Bedenken ist weiterhin, dass insbesondere in der Ganzzellkonfiguration Ströme mit zunehmender Messdauer abklingen können (*Run Down*). Für den I_M wird davon ausgegangen, dass dieses Problem zu einer Stromreduktion von 2-30 % innerhalb von 10-30 min führt (Hu et al., 2002). Da hier der Effekt von I_M -Modulatoren nach 10 min in der Ganzzellkonfiguration untersucht wurde, sollte dies nicht von allzu großer Relevanz sein. Dafür spricht ebenfalls, dass nicht einmal bei zusätzlicher I_M -Blockade durch XE991 ein Unterschied zum Kontrollniveau zu beobachten war. Dies wird durch die Stabilität von I_M -abhängigen Parametern über 45 min in der Ganzzellkonfiguration bestätigt (Yoshida & Alonso, 2007). Allerdings sind auch Ca^{2+} -abhängige Kaliumströme von größerer Bedeutung für die AHP (Pedarzani & Stocker, 2008). Die fAHP-Amplitude wurde durch XE991 ebenso reduziert wie das fAHP in hippokampalen Neuronen durch den I_M -Blocker Linopirdin (Yue & Yaari, 2004) und im Parasubikulum durch XE991 (Glasgow & Chapman, 2008). Das fAHP konnte durch I_M -Verstärkung nicht weiter verändert werden ebenso wie bereits von Yue & Yaari (2004) beschrieben.

Obgleich einige Arbeiten in Erwägung ziehen, dass Kv7.2 Homomere (Shah et al., 2002) Teil des I_M sind, ist dies kontrovers (Schwarz et al., 2006). Die langsame Aktivierung und Deaktivierung von Kaliumströmen in Ranvier-Schnürringen wird von Kv7.2 Homomeren vermittelt und durch Linopirdin und XE991 unterdrückt. Allerdings mit einer geringeren Affinität verglichen mit denen für Kv7.2-3 Heteromere. Es ist daher denkbar, dass der Block von Kv7.2 Homomeren die unterschiedliche Beeinflussung des Resonanzverhaltens zwischen der Blockierung und Verstärkung des I_M zu erklären vermag. Andererseits spricht der Befund, dass I_M -Verstärkung nur bei Depolarisation die Resonanz verändert, dafür, dass I_M am RMP für die Entstehung von Resonanz zu vernachlässigen ist und erst bei Depolarisation diese begünstigt.

Dem könnte auch zugrunde liegen, dass Sternzellen *per se* KCNQ-Kanäle nur in geringer Dichte exprimieren und erst bei maximaler Verstärkung durch Depolarisation und pharmakologische Intervention sichtbar werden.

In Sternzellen des mEC konnte nur die Resonanz unter Verstärkung des I_M bei Depolarisation insoweit moduliert werden, dass die Resonanzfrequenz anstieg und die Resonanzpräferenz präziser wurde. Unterschwellige MPOs wurden weder durch die Verstärkung noch durch die Blockade des I_M beeinflusst. Das stimmt mit den Beobachtungen von Yoshida & Alonso (2007) überein. Die Blockade mit Linopirdin unterdrückte die MPOs nur in Zellen der Schicht V des mEC. Daraus ergibt sich, dass der I_M eventuell schichtspezifisch einen Beitrag zur Modulation des θ -Rhythmus und damit zu Gedächtnisprozessen liefert. Bisher wurde angenommen, dass Resonanz und MPOs zwei unterschiedliche Eigenschaften sind, die auf demselben Mechanismus basieren (Lampl & Yarom, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Effekte der Modulation von I_M bestätigt sich diese Annahme zumindest nicht für den I_M . Zusammenfassend besitzt die Modulation des I_M das Potenzial bei der Modellierung der Resonanz und neuronalen Erregbarkeit der Sternzellen zu unterstützen. Diese Eigenschaften sind wichtige Grundlagen für die Gedächtnisfunktion. Möglicherweise reicht unter Ruhebedingungen eine geringe I_M -Dichte aus, um das RMP zu modulieren, nicht jedoch die Rheobase und das Schwellenpotential. Aktivierung sämtlicher M-Kanäle durch ICA und RTG könnte jedoch effektiver in der Modulation beider sein.

4.3.2 Modulation der Sternzeleigenschaften durch den I_h

Die neuronale Erregbarkeit von Sternzellen war aufgrund der Hyperpolarisation nach I_h -Blockade reduziert. Die Hyperpolarisation reduzierte die Wahrscheinlichkeit einer AP-Auslösung. Dem stand der gleichzeitige Anstieg des Membranwiderstandes gegenüber. Die Spannungsantwort auf eine Strominjektion war dementsprechend vergrößert. Zum anderen war die neuronale Erregbarkeit durch Verschiebung des AP-Schwellenpotentials in depolarisierende Richtung verringert. In Experimenten, in denen die Hyperpolarisation nach I_h -Blockade durch eine konstante Strominjektion kompensiert wurde, war die AP-Frequenz auf gleiche transiente Strominjektionen erhöht. Das bedeutet, dass I_h die Erregbarkeit von Sternzellen primär durch die Verschiebung des Membranpotentials in depolarisierender Richtung erhöht. Diese Befunde stimmen mit Beobachtungen von CA1 Pyramidenzellen des Hippokampus überein (Maccaferri & McBain, 1996). Sowohl das SAG-Potential als auch das *Rebound* waren fast vollständig durch ZD7288 unterdrückt. Ebenso fand sich eine Reduktion des fAHPs und des sAHPs einzelner APs ähnlich wie im *Gyrus dentatus* beobachtet (Aponte et al., 2006). Außerdem führte die I_h -Blockade zu einer deutlichen Veränderung des Entladungsverhaltens von Sternzellen. Wodurch

sind HCN-Kanäle in der Lage das Muster der APs von Sternzellen zu kontrollieren? In Sternzellen folgt dem einzelnen AP eine AHP mit einem biphasischen Verlauf. Bisher wurde allgemein angenommen, dass die AHP durch Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle und I_M vermittelt wird. Die schnelle Erholung nach der langsameren mAHP scheint für die Ausbildung von AP-*Clustern* wichtig zu sein. *Cluster*-Verhalten setzt voraus, dass die Auslösung eines weiteren APs kurz nach dem Abklingen der vorhergehenden mAHP erfolgt, wobei die Halbbreite der mAHP mit der Wahrscheinlichkeit korreliert, dass *Cluster* auftreten (Nolan et al., 2007). Es wird angenommen, dass I_h an der AHP-Generierung beteiligt ist (Maccaferri et al., 1993; Gu et al., 2005). I_h ist ein langsamer Einwärtsstrom, der mit Hyperpolarisation aktiviert wird. Das Umkehrpotential liegt bei ~ -30 mV, was mit einer gemischten Permeabilität für Natrium und Kaliumionen vereinbar ist (Richter et al., 2000; Aponte et al., 2006). Die Schwelle zur Aktivierung liegt bei ~ -50 mV (DiFrancisco et al., 1986; Tokimasa & Akasu, 1990), was konsequenterweise bedeutet, dass es zu einer erheblichen Aktivierung von I_h während einer auf ein AP folgenden AHP kommt. Die AHP verschiebt das Membranpotential in einen Bereich, der dem Aktivierungsbereich des I_h entspricht. Da die AHP-Amplitude Potentiale erreicht, bei denen I_h aktiviert ist, wurde der Einfluss des I_h auf die Form der AHP durch eine Blockade des I_h untersucht. Im Gegensatz zu der Kontrolle war die mAHP-Halbbreite des ersten APs (nicht auf altes RMP geklemmt) nach I_h -Blockade deutlich verlängert. Somit konnte gezeigt werden, dass der I_h die AP-Frequenz durch eine Beschleunigung der mAHP beeinflusst, wohingegen die mAHP-Amplitude unverändert blieb. Diese Daten stehen im Einklang mit einem durch HCN-Kanäle vermittelten Einwärtsstrom, der während der mAHP aktiv ist, um die schnelle Erholung der AHPs zu unterstützen. Eine Aktivierung von I_h erhöht die Wahrscheinlichkeit ein weiteres anschließendes AP zu initiieren. Damit ist I_h ein wichtiger Parameter für die AP-Frequenz und das *Cluster*-Verhalten. Ein weiterer Punkt ist die unterschiedliche, subzelluläre Verteilung der KCNQ- und HCN-Kanäle. Eine hohe Dichte an HCN-Kanälen befindet sich an distalen Dendriten (Magee, 1998; Ulrich, 2002), während KCNQ-Kanäle in größerer Dichte im axonalen Initialsegment, Soma und proximale Dendriten vorhanden sind (Shah et al., 2002; Chung et al., 2006; Weber et al., 2006; Rasmussen et al., 2007; Shah et al., 2008). Es ist demzufolge schwierig, aus Veränderungen der AHP am Soma auf einen bestimmten Mechanismus zu schließen. Auch ist von Bedeutung, dass im Gegensatz zum I_M und Ca^{2+} -abhängigen Kaliumkanälen I_h insbesondere bei Hyperpolarisation zu der mAHP beitragen kann (Storm, 1989, 1990; Williamson & Alger, 1990; Stocker et al., 1999; Stackman et al., 2002) und das Membranpotential eines aktiven Neurons inhomogen ist.

Das Resonanzverhalten und MPOs in Sternzellen des mEC sind abhängig vom Membranpotential. Das Resonanzphänomen nahm mit Hyperpolarisation zu und wurde durch

ZD7288 vollständig aufgehoben. Auch zeigen Studien mit Mäusen, bei denen die HCN-Gene ausgeschaltet sind, ein gemindertes Resonanzverhalten (Nolan et al., 2007). Dieses spricht für ein I_h -vermitteltes Resonanzverhalten in Sternzellen. Die Reduzierung der MPOs an der Rheobase der Kontrolle nimmt mit weiterer Depolarisation ab. Daher resultiert möglicherweise die Reduzierung der MPOs durch ZD7288 aus der Abnahme des Membranwiderstandes und nicht durch die Blockierung der induktiven Wirkung des I_h (Dickson et al., 2000).

4.3.3 Modulation der Sternzeleigenschaften durch Losigamon

Der hier verwendete I_{NaP} -Blocker Losigamon hatte keine signifikante Wirkung auf das Resonanzverhalten von Sternzellen, obwohl MPOs in Sternzellen durch TTX vollständig unterdrückt werden können (Alonso & Llinás, 1989). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass unter-schwellige Resonanz und MPOs durch verschiedene Mechanismen entweder generiert oder moduliert werden. Auf der anderen Seite zeigen Pyramidenzellen in der CA1 Region und des Subikulums reduziertes Resonanzverhalten bei starker Depolarisation unter TTX (Hu et al., 2002; Wang et al., 2006). Das deutet daraufhin, dass spannungsabhängige Natriumkanäle Resonanz ganz allgemein verstärken können. Es scheint unwahrscheinlich, dass das auch für I_{NaP} in Sternzellen zutrifft. Losigamon war wirksam, wie deutlich am Entladungsverhalten zu sehen ist (Abb. 28), ohne die Resonanz selbst über zwei Stunden nachhaltig zu verändern. Natriumkanäle in verschiedenen zellulären Kompartimenten können jedoch möglicherweise unterschiedliche pharmakologische Sensitivitäten besitzen (Fleidervish et al., 2008). Wenn also das Entladungsverhalten von einem Kompartiment gesteuert wird, das nicht maßgeblich an der Entstehung von Resonanz beteiligt ist (zum Beispiel dem Dendritenbaum, siehe auch Ulrich, 2002), so besteht trotz der hier beschriebenen Effekte die Möglichkeit, dass Losigamon nicht den I_{NaP} blockiert, der möglicherweise das Resonanzverhalten unterstützt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass HCN-Kanäle in Sternzellen in der Schicht II des mEC eine molekulare Schlüsselkomponente des Resonanzverhaltens und damit möglicherweise in der Informationsweiterleitung darstellen.

4.4 ELEKTROPHYSIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES M-KANAL-MODULATORS ICA IM HIPPOKAMPUS

Da sich in Experimenten an Sternzellen herausstellte, dass der I_M in unter-schweligen Membranpotentialen fast nicht aktiv war, wurde ein weiterer Zelltyp untersucht, der deutlichere I_M Expression zeigt. Dazu wurde der Effekt eines neuen M-Kanal-Aktivator ICA auf intrinsische Eigenschaften und das Resonanzverhalten von CA1 Pyramidenzellen untersucht. Darüber hinaus

wurde diese Substanz auf ihre Wirkung auf die synaptische Übertragung und als Antikonvulsivum in der hippocampalen CA1 Region überprüft.

Pyramidenzellen und einige Interneurone im Hippokampus exprimieren KCNQ-Kanäle 2/3 und 5 (Shah et al., 2002; Lawrence et al., 2006). Der I_M im Hippokampus wird durch die Heteromere 2/3 und 3/5 und auch KCNQ2-Homomere vermittelt (Jentsch, 2000; Lawrence et al., 2006; Tzingounis & Nicoll, 2008). Der I_M wurde in Pyramidenzellen in Hirnschnitten sowohl in somatischen (Hu et al., 2002; Shah et al., 2008) als auch in dendritischen (Chen & Johnston, 2004) Ableitungen beschrieben.

Es zeigte sich eine Reduktion des Membranwiderstandes und eine gleichzeitige Abnahme der neuronalen Erregbarkeit unter ICA. Diese Befunde deuten auf eine Beteiligung des I_M an der Aufrechterhaltung der intrinsischen Zelleigenschaften in hippocampalen Pyramidenzellen hin. Jedoch wurden nicht alle untersuchten intrinsischen Zelleigenschaften wie erwartet durch ICA beeinflusst. Das Resonanzverhalten wurde weder in Hinsicht auf die Frequenz noch den Q-Faktor an allen untersuchten Membranpotentialen von einer zusätzlichen Aktivierung des I_M beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen auch, dass die Aktivierung des hippocampalen I_M durch ICA mit einer Hyperpolarisation der Zellen, mit einer Reduktion des Membranwiderstandes und mit einem Anstieg des Schwellenpotentials einhergeht. Vergleichbares wurde bereits für Retigabin zuerst in entorhinalen Neurone (Hetka et al., 1999) und später auch in hippocampalen Neuronen beschrieben (Tatulian et al., 2001). Darüber hinaus induzierte ICA eine geringe Zunahme der mAHP-Amplitude des ersten ausgelösten APs, welches in Pyramidenzellen durch Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle und dem I_M getragen werden kann (Peters et al., 2005; Pedarzani & Stocker, 2008). Es trägt dadurch zur Adaptation der AP-Frequenz bei. Es ist interessant, dass ICA eine Hyperpolarisation auslöst, die in Sternzellen Resonanz begünstigen würde, ohne hier die Resonanz zu verstärken. Das bedeutet, dass entweder die I_h -Dichte in Pyramidenzellen zu gering ist, oder die HCN-Untereinheiten oder deren Modulation durch intrazelluläre Signalkaskaden die Ausbildung höherfrequenter oder deutlicherer Resonanz unterbinden. Allerdings steigt die I_h -Dichte im Dendritenbaum von Pyramidenzellen mit zunehmender Entfernung zum Soma ebenso an wie die Resonanz (Magee, 1998; Ulrich, 2002; Narayanan & Johnston, 2007). Eine durch Hyperpolarisation verstärkte I_h -Resonanz im Dendriten könnte demzufolge durch ICA ausgelöst werden, ohne am Soma sichtbar zu sein.

Vor 10 Jahren entdeckte man, dass Retigabin eine antikonvulsive Wirkung in unterschiedlichen *in vivo* und *in vitro* Epilepsiemodellen, das chronische Epilepsie-Modell (*Kindling* Modell) eingeschlossen, besitzt (Armand et al., 1999, 2000). Später konnte nachgewiesen werden, dass diese antikonvulsive Wirkung abhängig von der Aktivierung der KCNQ2/3 Kanäle ist (Rundfeldt & Netzer, 2000). Dieser Befund ist besonders interessant, da Mutationen im KCNQ-

Kanal unter anderem Epilepsie auslösen können. Die gleichzeitige Mutation von KCNQ2/3 wird für benigne Neugeborenenkrämpfe verantwortlich gemacht, welche eine vererbte Form von Epilepsie darstellen (Singh et al., 1998; Charlier et al., 1998; Biervert & Steinlein, 1999). Retigabin verstärkt jedoch möglicherweise auch über den postsynaptischen GABA_A Rezeptor die synaptische Hemmung, was zu seiner antikonvulsiven Wirkung beitragen würde. Effekte auf die hemmende und erregende synaptische Transmission in hippocampalen Zellkultur wurden auch für den I_M-Aktivator NH6 berichtet (Peretz et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte hier keine Veränderung der Amplitude oder der Frequenz der EPSCs und IPSCs durch ICA in CA1 Pyramidenzellen beobachtet werden.

Des Weiteren konnte hier für ICA eine eindeutige antikonvulsive Wirkung sowohl im Hippokampus als auch im EC ohne eine erkennbare Wirkung auf die synaptische Übertragung nachgewiesen werden. Die Aktivierung des I_M durch ICA führte zur reversiblen Blockierung der epileptischen Nachentladungen in der CA1 Pyramidenzellschicht und der Krämpfe im mEC. Dieser Befund bestätigt die Eignung von I_M-Aktivatoren als Antiepileptika. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht geklärt. Die Aktivierung des I_M im axonalem Initialsegment reguliert das Schwellenpotential zur AP-Auslösung, wogegen im apikalen Dendriten möglicherweise die neuronale Erregbarkeit besonders in pathophysiologischen, von *Übererregbarkeit gekennzeichneten Zuständen* beeinträchtigt ist (Yue & Yaari, 2006). Dennoch konnte weder ein Effekt auf s/mEPSCs noch auf s/mIPSCs in CA1 Pyramidenzellen gezeigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ICA die Glutamatfreisetzung aus den Terminalien ändert, die den M-Kanal besitzen jedoch nicht CA1 Pyramidenzellen kontaktieren. Dagegen reduziert NH6 die Frequenz der mEPSCs und mIPSCs in hippocampaler Zellkultur (Peretz et al., 2007), weshalb hier eventuell mehr Seiteneffekte zu erwarten sind.

Es wird allgemein angenommen, dass die intrinsische Resonanz verschiedener Neuronenpopulationen zur Generation von kohärenten Netzwerkoszillationen beiträgt. (Buzsáki, 2002). Die Resonanzfrequenz hippocampaler Pyramidenzellen und OLM-Interneurone liegt im unteren θ -Bereich, wohingegen schnellfeuernde Interneurone, deren Zellsoma in der Pyramidenzellschicht liegen, Resonanz im γ -Bereich zeigen könnten (Pike et al., 2000). Mithilfe theoretischer Modelle konnte gezeigt werden, dass Resonanzverhalten von langsam aktivierenden Leitfähigkeiten, die zur Stabilisierung des RMPs beitragen, verstärkt werden kann (Hutcheon & Yarom, 2000). Dadurch wird, wie bereits für Sternzellen besprochen, der I_M zu einem attraktiven Kandidaten. Es konnte jedoch kein Effekt auf das Resonanzverhalten, weder bei Depolarisation, noch am RMP oder bei Hyperpolarisation auf CA1 Pyramidenzellen beobachtet werden. Der Q-Faktor ist relativ gering im Vergleich zu anderen resonanten

Zellpopulationen, insbesondere bei Depolarisation, wo der I_M besonders aktiv ist. Offensichtlich ist es notwendig, Pyramidenzellen unter TTX stark zu depolarisieren, um den Einfluss vom I_M herauszuarbeiten (Hu et al., 2002). Es bleibt bei derartigen Manipulationen jedoch offen, inwiefern sie in physiologischen Situationen von Bedeutung sind. Der I_M ist also sowohl in CA1 Pyramidenzellen als auch in Sternzellen ein Modulator der Erregbarkeit. Er scheint jedoch nicht ursächlich für Resonanz verantwortlich zu sein.

4.5 NETZWERKOSZILLATIONEN

Ziel war es zu überprüfen, inwiefern die Leitfähigkeiten, welche die Erregbarkeit, MPOs und Resonanz von Neuronen modulieren können, auch Netzwerkoszillationen beeinflussen können. Hier war die Annahme, dass eine Leitfähigkeit durch Resonanz im θ -Bereich die Einbindung von Neuronen in eine θ -Oszillation begünstigen würde.

Hierzu wurden Kainat-induzierte Netzwerkoszillationen im akuten Hirnschnitt der Ratte unter *Interface*-Bedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass γ -Oszillationen prominenter in der CA3 Region verglichen mit der CA1 Region war. Ähnliche Befunde ergaben sich auch *in vivo* (Bragin et al., 1995). Die γ -Oszillationen in der CA1 Region sind durch eine Phasenverschiebung von > 1 ms gegenüber der CA3 Region charakterisiert, welches für eine aktive Weiterleitung der neuronalen Netzwerkoszillationen der CA3 Region spricht (Fisahn et al., 1998). Die Tatsache, dass γ -Oszillationen in der hippocampalen CA3 Region generiert werden, findet durch die Beobachtung eines intrinsischen Netzwerkoszillators in der hippocampalen Subregion Bestärkung (Fischer, 2004).

Es stellte sich weiterhin heraus, dass das hippocampale Netzwerk mit Eigenschaften ausgestattet ist, die die Generation von θ - und γ -Oszillationen ermöglichen. Agonisten und auch Antagonisten vom I_M , I_{NaP} und I_h blockierten zuverlässig und konzentrationsabhängig sowohl Kainat-induzierte θ - also auch γ -Oszillationen in hippocampalen Hirnschnitten. Dies bestätigt die generelle Annahme, dass Netzwerkoszillationen auf vielen unterstützenden Mechanismen beruhen.

Darüber hinaus wurde erkennbar, dass I_M überwiegend die Power und damit die Koheränz der Netzwerkoszillationen ohne starken Einfluss auf die Netzwerkfrequenz bestimmt. Im Gegensatz dazu waren I_h und I_{NaP} an der Festlegung der Power und der Frequenz der Netzwerkoszillationen beteiligt. Die Power und die Amplitude der untersuchten Netzwerkoszillationen in der Kontrolle stimmt mit denen in der Literatur weitestgehend überein, wenn die Feldpotentialaufnahmen unter *Interface*-Bedingungen durchgeführt wurden (Stenkamp et al., 2001; Weiss et al., 2003; Fano et al., 2007; Wojtowicz et al., 2009). Die Latenz des Substanzeffektes war generell variabel und

abhängig von der verwendeten Substanz und deren Konzentration. Die relativ lange Verzögerung beruht wahrscheinlich auf der langsamen Diffusion, die unter *Interface*-Bedingungen beobachtet wird (Müller et al., 1988; Albrecht & Heinemann, 1989; Gloveli et al., 1995; Sokolova et al., 1998).

4.5.1 Netzwerkoszillationen im θ -Bereich

Es wurde kürzlich nachgewiesen, dass eine lokale Applikation (*Puff Application*) von Kainat in koronaren Hirnschnitten mit longitudinaler Konnektivität der Maus θ -Oszillationen induzieren kann (Gloveli et al., 2005a). Im Fall von θ -Oszillationen gibt es Anhaltspunkte aus Ableitungen *in vivo*, die darauf hindeuten, dass diese durch Interaktion zwischen dem Septum und dem Hippokampus zustande kommen. Hier wurden relativ langsame Oszillationen um 10 Hz in isolierten dorsalen hippokampalen Hirnschnitten mit koronarer Schnittführung unabhängig von der cholinergen Aktivierung induziert. Dieser Befund deutet auf einen intrinsischen Mechanismus innerhalb des Hippokampus hin, der zusätzlich zum septalen und cholinergen Aktivitätseingang zur Generierung von Netzwerkoszillationen im θ -Bereich beiträgt. In koronaren Hirnschnitten erreichten die Netzwerkoszillationen Frequenzen von bis zu 15 Hz. Dieses entspricht dem Frequenzbereich von MPOs und Resonanz (beispielsweise im EC). Beachtung sollte den Definitionen von Oszillationsfrequenzen innerhalb des Hippokampus je nach untersuchter Tierspezies geschenkt werden. Das Frequenzspektrum variiert von 8 Hz (Buzsáki, 2002) bis zu 12 Hz (Cobb et al., 1999; Fellous & Sejnowski, 2000) oder sogar bis zu 15 Hz (Fischer et al., 2002; Fischer, 2004). Im ZNS weisen unterschiedliche Neuronentypen entweder MPOs und/oder Resonanz im θ -Bereich auf (Puil et al., 1994; Lampl & Yarom, 1997; Manseau et al., 2008). Derartige MPOs wurden ebenfalls in Zellen in tiefen Schichten des EC und in Zellen gefunden, welche vom Perirhinalkortex zum EC projizieren (Schmitz et al., 1998; Bilkey & Heinemann, 1999). Einige Zellen in den tiefen Schichten projizieren nicht nur zu den höheren Schichten sondern auch zum DG, was auf eine eventuelle Beteiligung an der Generierung der Netzwerkoszillationen hindeutet (Gloveli et al., 2001; Dugladze et al., 2001). Resonanz im θ -Bereich beruht unter anderem auf die Aktivierung spannungsabhängiger Kanäle.

Bisher wurden I_h , I_{NaP} und der muskarin-modulierte I_M als Quelle synchroner Aktivität von hippokampalen Pyramidenzellen (Hu et al., 2002) und kortikalen Zelltypen (Yoshida & Alonso, 2007) identifiziert. Zusätzlich könnte die Generierung der θ -Netzwerkoszillationen von den Eigenschaften von OLM-Interneurone, welche resonant im θ -Bereich sind, und anderen Interneuronen abhängen (Fischer et al., 2002; Fischer, 2004; Gloveli et al., 2005b; Dugladze et al., 2007). Die Rolle des I_M in der Entstehung von θ -Oszillation im Hippokampus wird einerseits

durch pharmakologische Experimente und andererseits durch genetische Manipulationen stark untermauert (Hu et al., 2002; Peters et al., 2005).

Folglich ist anzunehmen, dass die Entstehung von Oszillationen im θ -Bereich von intrinsischen Zelleigenschaften abhängig ist und insbesondere von I_M , I_{NaP} und I_h . Diese Ströme beeinflussen auch die neuronale Erregbarkeit und können demzufolge die Generierung von synchronen Netzwerkoszillationen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen. Es konnte hier gezeigt werden, dass die Blockade des I_M durch XE991 zur Reduzierung der θ -Netzwerkoszillationen führt. Die Ausschaltung des I_M durch konditionale Expression des dominant-negativen KCNQ2-Kanals resultiert in einem reduzierten Resonanzverhalten in CA1 Pyramidenzellen (Peters et al., 2005). Es wurde beobachtet, dass XE991 hauptsächlich die Power der Netzwerkoszillation reduziert, wohingegen die Frequenz stabil blieb. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass I_M möglicherweise die Rekrutierung von Neuronen in das oszillierende Neuronensemble durch Einzelzellresonanz unterstützt (Hu et al., 2002; Peters et al., 2005). Alternativ könnte angenommen werden, dass ein Anstieg der neuronalen Erregbarkeit aus der I_M -Blockade resultiert (Jentsch, 2000; Peters et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Shah et al., 2008) und das dazu führt, dass Zellen nicht mehr an der rhythmischen Aktivität teilnehmen können. Der Einfluss der Erregbarkeit wird zusätzlich bei der Aktivierung des I_M durch Retigabin deutlich (Rundfeldt & Netzer, 2000). Hier sind die Neuronen weniger erregbar und gleichzeitig sind θ -Oszillationen gemindert. Zusammenfassend könnte der I_M die θ -Oszillationen über Einzelzellresonanz unterstützen, aber möglicherweise über die Veränderung der Erregbarkeit unabhängig von der Richtung der Manipulation die Netzwerkaktivität mindern.

Die Expression von I_{NaP} in der hippocampalen Formation ist sehr gut beschrieben und es gibt experimentelle Hinweise auf seine Beteiligung an Resonanz (Hu et al., 2002) und an salvenartigen AP-Entladungen (Su et al., 2001) in Pyramidenzellen. Hier wurde Losigamon getestet, welches einen antikonvulsiven Effekt (Zhang et al., 1992) durch Blockade des I_{NaP} (Gebhardt et al., 2001) ausübt. Die Blockade des I_{NaP} durch Losigamon bestätigt die angenommene Rolle in der Generierung von Netzwerkoszillationen. Interessantweise ist weder die Amplitude der mIPSCs und mEPSCs noch deren Frequenz (Draguhn et al., 1997) durch Losigamon beeinflusst. Das deutet auf eine spezifischere Wirkung als andere antiepileptischen Substanzen wie Carbamazepin oder Phenytoin hin, die ebenfalls über die Blockierung spannungsabhängiger Natriumkanäle wirken (Meldrum & Rogawski, 2007).

Das Resonanzverhalten ist abhängig von I_h , was hier für Sternzellen nachgewiesen wurde, aber auch für Pyramidenzellen gilt (Hu et al., 2002). Ferner ist die Entstehung einer Epilepsie von reduzierter HCN-Kanalexpression und parallel von reduzierter Resonanz *in vitro* und

verringerten Oszillation *in vivo* im θ -Bereich begleitet (Marcelin et al., 2009). Es ist wichtig zu erwähnen, dass Oszillationen im θ -Bereich abhängig von intakter Inhibition sind, wie kürzlich in einer *in vivo* Studie gezeigt wurde (Wulff et al., 2009). Insbesondere könnten OLM-Interneurone eine Schlüsselstelle für die Entstehung von θ -Rhythmen im Hippokampus einnehmen. Dieser Zelltyp weist stark ausgeprägte intrinsische θ -Rhythmen auf und feuert synchron mit θ -Netzwerkoszillationen (Maccaferri & McBain, 1996; Saraga et al., 2003). Er exprimiert weiterhin I_h (Maccaferri & McBain, 1996; Saraga et al., 2003; Rotstein et al., 2005; Dugladze et al., 2007) und generiert APs im θ -Rhythmus während der θ -Oszillationen (Gillies et al., 2002; Gloveli et al., 2005a; Gloveli et al., 2005b). Demzufolge könnte das Feuern von APs im θ -Rhythmus in Verbindung mit I_h stehen und θ -Oszillation wiederum abhängig von der Anwesenheit von I_h sein. Tatsächlich führt die Blockade des I_h hier zu einer signifikanten Reduktion der θ -Oszillationen. Jedoch repräsentieren hippokampale Interneurone eine höchst heterogene Population von denen einige I_h exprimieren (Savic et al., 2001; Somogyi & Klausberger, 2005; Aponte et al., 2006). Daher können die Effekte der unterschiedlichen Substanzen nicht alleine dem Resonanzverhalten von OLM-Interneurone zugeschrieben werden. Die Auswirkung auf die synaptische Interaktion und auf präsynaptische Terminalien oder Axone könnte ebenfalls zum Effekt der Substanzen beitragen. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Effekte von ZD7288 auf θ -Oszillationen über direkte Beeinflussung der dendritischen Elektrogenese der Pyramidenzellen hervorgerufen werden.

4.5.2 Netzwerkoszillationen im γ -Bereich

Es bestätigt sich in dieser Studie, dass Kainat wie auch Carbachol, Agonisten metabotroper Glutamatrezeptoren und hohe Konzentrationen von Kalium Netzwerkoszillationen im γ -Bereich in horizontalen Hirnschnitten induzieren können. Ableitungen in der Pyramidenzellschicht, die anschließend nicht zusätzlich gefiltert wurden, zeigen γ -Wellen mit überlagerten *Spikelets* unterschiedlicher Amplitude. Die Häufigkeit dieser *Spikelets* nimmt mit der Entfernung (Richtung *Stratum oriens* oder *Stratum radiatum*) von der Pyramidenzellschicht ab. Wie kürzlich veröffentlicht wurde, ist die Entladungsrate von Pyramidenzellen während der Netzwerkoszillation ungeachtet von der Art der Induktion niedrig (Fisahn et al., 1998; Fischer et al., 2002; Weiss et al., 2003; Hajos et al., 2004; Fano et al., 2007; Wojtowicz et al., 2009). Somit kann nahezu ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um epileptische Entladungen handelt. Es ist also wahrscheinlicher, dass sie Entladungen unterschiedlicher Neurone widerspiegeln, die zu verschiedenen Zeitpunkten während des γ -Rhythmuses aktiv sind. Darüber hinaus sind

wahrscheinlich zusätzlich verschiedene Interneurone an dieser Aktivität beteiligt (Klausberger & Somogyi, 2008).

Netzwerkoszillationen im γ -Bereich sind in hohem Grade abhängig von Wechselwirkungen innerhalb des neuronalen Netzwerkes zwischen erregenden Pyramidenzellen und hemmenden Interneuronen (Whittington et al., 1995; Fisahn et al., 2004; Bartos et al., 2007). Tatsächlich feuern einige hippocampale Zellen mit hemmender Wirkung wie zum Beispiel *Trilaminar*-Zellen, *Bistratified*-Zellen und Korbzellen synchron mit γ -Netzwerkoszillationen (Hajos et al., 2004; Gloveli et al., 2005b; Bartos et al., 2007; Tukker et al., 2007). Bisher wurden noch keine MPOs mit einer Frequenz im γ -Bereich beschrieben, jedoch scheinen einige schnellfeuernde Interneurone passive Zelleigenschaften zu besitzen, die es ihnen ermöglichen im γ -Bereich resonant zu sein (Pike et al., 2000). Es ist daher anzunehmen, dass die Effekte der unterschiedlichen Substanzen auf die Netzwerkoszillationen in erster Linie durch die Modulation des Schwellenpotentials, der Neurotransmitterausschüttung und des Membranwiderstandes der Neurone hervorgerufen werden.

γ -Oszillationen, welche mit einer Aktivierung von Kainat- oder metabotropen Glutamatrezeptoren induziert wurden, beruhen auf einer intakten Hemmung (Bartos et al., 2007; Pietersen et al., 2009). Es ist daher denkbar, dass die untersuchten Substanzen die Generierung der γ -Oszillationen auf der Ebene der Hemmung stören. Im DG haben kürzlich Studien gezeigt, dass schnellfeuernde Interneurone I_h exprimieren und die I_h Aktivierung die Frequenz von mIPSCs verringert ohne die Amplitude zu verändern (Aponte et al., 2006). Neben dem Effekt auf die Ausschüttung von GABA wird die Integration synaptischer Eingänge von Pyramidezellen durch I_h beeinflusst (Bernard & Johnston, 2003; Gu et al., 2005; Hu et al., 2007; Spruston, 2008). In hippocampalen Neuronen wird die zeitliche Summation durch I_h im Dendriten normalisiert (Magee, 1999). Des Weiteren verschiebt der I_h das Membranpotential aufgrund seines Umkehrpotentials in Richtung Depolarisation (Aponte et al., 2006). Die Blockierung des I_h führt zur Hyperpolarisation und entfernt möglicherweise auch so Zellen aus dem oszillierenden Ensemble von Interneuronen. Diese Befunde können also ebenso zu den hier beschriebenen Effekten von ZD7288 beitragen. Neben der Aktivierung durch Hyperpolarisation kann I_h durch zyklische Nukleotide moduliert werden. Forskolin, ein beta-Adrenorezeptor Agonist und D1 Rezeptor Agonist, reduziert γ -Oszillationen induziert durch verschiedene Substanzen (Wojtowicz et al., 2009). Dieses deutet zusätzlich auf einen multipeln Modulationsmechanismus der γ -Oszillationen hin. Für den heterogenen Effekt von 10 μ M ZD7288 könnte zum einen die unterschiedliche HCN-Expression und/oder die verschiedenen Sensitivitäten gegenüber ZD7288 in der hippocampalen Formation eine wichtige Rolle spielen

(Moosmang et al., 1999; Cheng et al., 2007). Außerdem ist möglicherweise die Weiterleitung der Netzwerkoszillationen von der CA3 Region zur CA1 Region in Anwesenheit von ZD7288 gestört.

Weiterhin führt die Blockade von I_h zur Hyperpolarisation von Zellen in der CA1 Region und damit zur Dämpfung der Netzwerkaktivität. Pharmakologische Unterdrückung der Leitfähigkeiten des KCNQ-Kanals wirkte sich negativ auf γ -Oszillationen aus. Der I_M ist, wie schon für ICA beschrieben, an der Entstehung der mAHPs in hippocampalen Pyramidenzellen beteiligt (Gu et al., 2005). Darüber hinaus bestimmt die AHP nicht nur das Entladungsverhalten einzelner Neurone sondern beeinflusst über *Gap Junctions* ganze Netzwerke gekoppelter Interneurone (Traub et al., 2001; Galarreta & Hestrin, 2001; Bartos et al., 2007; Tukker et al., 2007). Das Fehlen der AHP-abhängigen Netzwerksynchronisation könnte der partiellen Blockierung der γ -Oszillationen durch XE991 zugrunde liegen. Allerdings reduziert eine Aktivierung des I_M durch Retigabin ebenfalls eine Reduzierung der Netzwerkoszillation. Dies spiegelt möglicherweise die durch Verstärkung des I_M reduzierte Erregbarkeit wider. Somit könnte I_M durch die Balance zwischen AHP-vermittelten Synchronisation und Erregbarkeit eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Oszillationen darstellen.

Zusätzlich zu dem I_h und dem I_M , unterstützt auch der persistierende Natriumkanal MPOs, ist in an Einzellresonanz beteiligt und modifiziert die neuronale Erregbarkeit und den Zeitverlauf von IPSPs. Der I_{NaP} kann in verschiedenen Neuronen innerhalb des ZNS gefunden werden (Crill, 1996; Hu et al., 2002; Dorval, Jr. & White, 2005; Vervaeke et al., 2006; Hardie & Pearce, 2006). Zwar ist nicht geklärt in welchem Maße I_{NaP} das Entladungsverhalten von hippocampalen Interneuronen beeinflusst, jedoch könnte der blockierende Effekt auf Kainat-induzierte γ -Oszillationen auf ihre Anwesenheit in einigen Interneuronentypen hindeuten. Losigamon reduziert hochfrequente AP-Entladungen wahrscheinlich durch Blockierung des I_{NaP} ohne merklichen Einfluss auf hemmende und erregende Potentiale (Schmitz et al., 1995). Es scheint daher naheliegend, dass die Suppression der Oszillationen durch das Unterbinden hochfrequenter AP-Entladungen in Interneuronen zustande kommt. So erzeugen *Trilaminar*-Zellen sogenannte *Doublets* je γ -Zyklus, weshalb sie potenziell für die Entstehung von γ -Oszillationen wichtig sind und möglicherweise besonders durch Losigamon beeinträchtigt werden.

Insgesamt stellt sich der Zusammenhang zwischen den untersuchten Leitfähigkeiten von Einzelzellen und Netzwerkoszillationen wie folgt dar: Die Effekte aller Pharmaka unterschieden sich nicht wesentlich zwischen θ - und γ -Oszillationen. Von γ -Oszillationen wird angenommen, dass sie unabhängig von MPOs und Resonanz entstehen können. Eine Interpretation wäre also, dass den meisten hier beobachteten Effekten eine Veränderung der synaptischen Übertragung

(Aponte et al., 2006; Inaba et al., 2006; Peretz et al., 2007), eine Stabilisierung des RMP (French et al., 1990; Shah et al., 2008) oder aber die Regulierung der neuronalen Erregbarkeit (Peters et al., 2005; Vervaeke et al., 2006; Peretz et al., 2007) zugrunde liegt. Nichtsdestotrotz stehen die hier präsentierten Beobachtungen im Einklang mit der Hypothese, dass bestimmte Leitfähigkeiten wie der I_h durch ihren Beitrag zur Resonanz einzelner Neurone Netzwerkoszillationen im θ -Bereich unterstützen können.

A. LITERATURVERZEICHNIS

Acker, C. D., Kopell, N. & White, J. A. (2003). Synchronization of strongly coupled excitatory neurons: relating network behavior to biophysics. *J.Comput.Neurosci.* 15, 71-90.

Albrecht, D. & Heinemann, U. (1989). Low calcium-induced epileptiform activity in hippocampal slices from infant rats. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 48, 316-320.

Alonso, A. & Llinás, R. R. (1989). Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* 342, 175-177.

Alonso, A. & Klink, R. (1993). Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *J.Neurophysiol.* 70, 128-143.

Alzheimer, C., Schwindt, P. C. & Crill, W. E. (1993). Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J.Neurosci.* 13, 660-673.

Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31, 571-591.

Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1995). The hippocampal formation. In *The rat nervous system*, ed. Paxinos, G., Academic Press, New York, pp. 443-494.

Andersen, P., Bliss, T. V. T. & Skrede, K. K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp.Brain.Res.* 13, 222-238.

Anderson, W. W., Lewis, D. V., Swartzwelder, H. S. & Wilson, W. A. (1986). Magnesium-free medium activates seizure-like events in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 398, 215-219.

Aponte, Y., Lien, C. C., Reisinger, E. & Jonas, P. (2006). Hyperpolarization-activated cation channels in fast-spiking interneurons of rat hippocampus. *J.Physiol.* 574, 229-243.

Armand, V., Rundfeldt, C. & Heinemann, U. (1999). Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Naunyn Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 359, 33-39.

Armand, V., Rundfeldt, C. & Heinemann, U. (2000). Effects of retigabine (D-23129) on different patterns of epileptiform activity induced by low magnesium in rat entorhinal cortex hippocampal slices. *Epilepsia* 41, 28-33.

Astman, N., Gutnick, M. J. & Fleidervish, I. A. (2006). Persistent sodium current in layer 5 neocortical neurons is primarily generated in the proximal axon. *J.Neurosci.* 26, 3465-3473.

Bader, C. R., Macleish, P. R. & Schwartz, E. A. (1979). A voltage-clamp study of the light response in solitary rods of the tiger salamander. *J.Physiol.* 296, 1-26.

Bartos, M., Vida, I., Frotscher, M., Meyer, A., Monyer, H., Geiger, J. R. & Jonas, P. (2002). Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99, 13222-13227.

Bartos, M., Vida, I. & Jonas, P. (2007). Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat.Rev.Neurosci.* 8, 45-56.

Berger, H. (1929). Electroencephalogram in humans. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 87, 527-570.

Bernard, C. & Johnston, D. (2003). Distance-dependent modifiable threshold for action potential back-propagation in hippocampal dendrites. *J.Neurophysiol.* 90, 1807-1816.

Biel, M., Schneider, A. & Wahl, C. (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc.Med.* 12, 206-212.

Biervert, C., Schroeder, B. C., Kubisch, C., Berkovic, S. F., Propping, P., Jentsch, T. J. & Steinlein, O. K. (1998). A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Science* 279, 403-406.

Biervert, C. & Steinlein, O. K. (1999). Structural and mutational analysis of KCNQ2, the major gene locus for benign familial neonatal convulsions. *Hum. Genet.* 104, 234-240.

Bilkey, D. K. & Heinemann, U. (1999). Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer III/V perirhinal cortex neurons of the rat. *Hippocampus* 9, 510-518.

Black, J. A., Westenbroek, R., Minturn, J. E., Ransom, B. R., Catterall, W. A. & Waxman, S. G. (1995). Isoform-specific expression of sodium channels in astrocytes in vitro: immunocytochemical observations. *Glia* 14, 133-144.

Blackburn-Munro, G., Dalby-Brown, W., Mirza, N. R., Mikkelsen, J. D. & Blackburn-Munro, R. E. (2005). Retigabine: chemical synthesis to clinical application. *CNS. Drug Rev.* 11, 1-20.

Bland, B. H., Konopacki, J. & Dyck, R. H. (2002). Relationship between membrane potential oscillations and rhythmic discharges in identified hippocampal theta-related cells. *J. Neurophysiol.* 88, 3046-3066.

Boehlen, A., Kunert, A. & Heinemann, U. (2009). Effects of XE991, retigabine, losigamone and ZD7288 on kainate-induced theta-like and gamma network oscillations in the rat hippocampus in vitro. *Brain Res.* 1295, 44-58.

Bond, C. T., Maylie, J. & Adelman, J. P. (2005). SK channels in excitability, pacemaking and synaptic integration. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 305-311.

Bragin, A., Jando, G., Nadasdy, Z., Hetke, J., Wise, K. & Buzsáki, G. (1995). Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J. Neurosci.* 15, 47-60.

Brown, D. A. & Adams, P. R. (1980). Muscarinic Suppression of A Novel Voltage-Sensitive K⁺ Current in A Vertebrate Neuron. *Nature* 283, 673-676.

Brown, D. A. (1988). M currents. *Ion Channels* 1, 55-94.

Brown, H., DiFrancesco, D. & Noble, S. (1979). Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J. Exp. Biol.* 81, 175-204.

- Burton, B. G., Economo, M. N., Lee, G. J. & White, J. A. (2008). Development of theta rhythmicity in entorhinal stellate cells of the juvenile rat. *J.Neurophysiol.* 100, 3144-3157.
- Burwell, R. D. (2000). The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 911, 25-42.
- Buzsáki, G., Leung, L. W. & Vanderwolf, C. H. (1983). Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 287, 139-171.
- Buzsáki, G. (2002). Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, 325-340.
- Buzsáki, G., Buhl, D. L., Harris, K. D., Csicsvari, J., Czeh, B. & Morozov, A. (2003). Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116, 201-211.
- Buzsáki, G. & Draguhn, A. (2004). Neuronal oscillations in cortical networks. *Science* 304, 1926-1929.
- Buzsáki, G. (2005). Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus* 15, 827-840.
- Chapman, C. A. & Lacaille, J. C. (1999). Intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in hippocampal CA1 interneurons of stratum lacunosum-moleculare. *J.Neurophysiol.* 81, 1296-1307.
- Charlier, C., Singh, N. A., Ryan, S. G., Lewis, T. B., Reus, B. E., Leach, R. J. & Leppert, M. (1998). A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family. *Nat.Genet.* 18, 53-55.
- Chen, S., Wang, J. & Siegelbaum, S. A. (2001). Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J.Gen.Physiol.* 117, 491-504.
- Chen, X. & Johnston, D. (2004). Properties of single voltage-dependent K⁺ channels in dendrites of CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J.Physiol.* 559, 187-203.

Cheng, L., Kinard, K., Rajamani, R. & Sanguinetti, M. C. (2007). Molecular mapping of the binding site for a blocker of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-modulated pacemaker channels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 322, 931-939.

Chrobak, J. J. & Buzsáki, G. (1998). Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J.Neurosci.* 18, 388-398.

Chung, H. J., Jan, Y. N., & Jan, L. Y. (2006). Polarized axonal surface expression of neuronal KCNQ channels is mediated by multiple signals in the KCNQ2 and KCNQ3 C-terminal domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 103, 8870-8875.

Cobb, S. R., Bulters, D. O., Suchak, S., Riedel, G., Morris, R. G. & Davies, C. H. (1999). Activation of nicotinic acetylcholine receptors patterns network activity in the rodent hippocampus. *J.Physiol.* 518, 131-140.

Connor, J. A. & Stevens, C. F. (1971). Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *J.Physiol.* 213, 31-53.

Crill, W. E. (1996). Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu.Rev.Physiol.* 58, 349-362.

Dalby-Brown, W., Hansen, H. H., Korsgaard, M. P., Mirza, N. & Olesen, S. P. (2006). K(v)7 channels: function, pharmacology and channel modulators. *Curr.Top.Med.Chem.* 6, 999-1023.

Delmas, P. & Brown, D. A. (2005). Pathways modulating neural KCNQ/M (Kv7) potassium channels. *Nat.Rev.Neurosci.* 6, 850-862.

Dickson, C. T., Magistretti, J., Shalinsky, M., Hamam, B. & Alonso, A. (2000). Oscillatory activity in entorhinal neurons and circuits. Mechanisms and function. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 911, 127-150.

DiFrancesco, D. (1982). Block and activation of the pace-maker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J.Physiol.* 329, 485-507.

- DiFrancesco, D. (1986). Characterization of single pacemaker channels in cardiac sino-atrial node cells. *Nature* 324, 470-473.
- DiFrancesco, D. & Tortora, P. (1991). Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351, 145-147.
- Dolorfo, C. L. & Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *J.Comp.Neurol.* 398, 25-48.
- Dorval, A. D., Jr. & White, J. A. (2005). Channel noise is essential for perithreshold oscillations in entorhinal stellate neurons. *J.Neurosci.* 25, 10025-10028.
- Draguhn, A., Jungclauss, M., Sokolowa, S. & Heinemann, U. (1997). Losigamone decreases spontaneous synaptic activity in cultured hippocampal neurons. *Eur.J.Pharmacol.* 325, 245-251.
- Dugladze, T., Heinemann, U. & Gloveli, T. (2001). Entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation in vitro. *Brain Res.* 905, 224-231.
- Dugladze, T., Vida, I., Tort, A. B., Gross, A., Otahal, J., Heinemann, U., Kopell, N. J. & Gloveli, T. (2007). Impaired hippocampal rhythmogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104, 17530-17535.
- Eichenbaum, H. & Lipton, P. A. (2008). Towards a functional organization of the medial temporal lobe memory system: role of the parahippocampal and medial entorhinal cortical areas. *Hippocampus* 18, 1314-1324.
- Empson, R. M. & Heinemann, U. (1995). The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *J.Physiol.* 484, 707-720.
- Engel, A. K., Fries, P., König, P., Brecht, M. & Singer, W. (1999). Temporal binding, binocular rivalry, and consciousness. *Conscious.Cogn.* 8, 128-151.

Engel, T. A., Schimansky-Geier, L., Herz, A. V., Schreiber, S. & Erchova, I. A. (2008). Subthreshold membrane-potential resonances shape spike-train patterns in the entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* 100, 1576-89.

Erchova, I., Kreck, G., Heinemann, U. & Herz, A. V. (2004). Dynamics of rat entorhinal cortex layer II and III cells: characteristics of membrane potential resonance at rest predict oscillation properties near threshold. *J.Physiol.* 560, 89-110.

Faber, E. S. & Sah, P. (2007). Functions of SK channels in central neurons. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 34, 1077-1083.

Fano, S., Behrens, C. J. & Heinemann, U. (2007). Hypoxia suppresses kainate-induced gamma-oscillations in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 18, 1827-1831.

Fellous, J. M. & Sejnowski, T. J. (2000). Cholinergic induction of oscillations in the hippocampal slice in the slow (0.5-2 Hz), theta (5-12 Hz), and gamma (35-70 Hz) bands. *Hippocampus* 10, 187-197.

Fellous, J. M., Houweling, A. R., Modi, R. H., Rao, R. P., Tiesinga, P. H. & Sejnowski, T. J. (2001). Frequency dependence of spike timing reliability in cortical pyramidal cells and interneurons. *J.Neurophysiol.* 85, 1782-1787.

Fisahn, A., Pike, F. G., Buhl, E. H. & Paulsen, O. (1998). Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro. *Nature* 394, 186-189.

Fisahn, A., Contractor, A., Traub, R. D., Buhl, E. H., Heinemann, S. F. & McBain, C. J. (2004). Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations. *J.Neurosci.* 24, 9658-9668.

Fischer, Y., Wittner, L., Freund, T. F. & Gähwiler, B. H. (2002). Simultaneous activation of gamma and theta network oscillations in rat hippocampal slice cultures. *J.Physiol.* 539, 857-868.

Fischer, Y. (2004). The hippocampal intrinsic network oscillator. *J.Physiol.* 554, 156-174.

Fleidervish, I. A., Libman, L., Katz, E. & Gutnick, M. J. (2008). Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na⁺ channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105, 18994-18999.

Fransen, E., Alonso, A. A., Dickson, C. T., Magistretti, J. & Hasselmo, M. E. (2004). Ionic mechanisms in the generation of subthreshold oscillations and action potential clustering in entorhinal layer II stellate neurons. *Hippocampus* 14, 368-384.

Franz, O., Liss, B., Neu, A. & Roeper, J. (2000). Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels (I_h) in central neurons. *Eur.J.Neurosci.* 12, 2685-2693.

French, C. R., Sah, P., Buckett, K. J. & Gage, P. W. (1990). A voltage-dependent persistent sodium current in mammalian hippocampal neurons. *J.Gen.Physiol.* 95, 1139-1157.

Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I. & Moser, M. B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305, 1258-1264.

Galarreta, M. & Hestrin, S. (2001). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat.Rev.Neurosci.* 2, 425-433.

Garden, D. L., Dodson, P. D., O'Donnell, C., White, M. D. & Nolan, M. F. (2008). Tuning of synaptic integration in the medial entorhinal cortex to the organization of grid cell firing fields. *Neuron* 60, 875-889.

Gasparini, S. & DiFrancesco, D. (1997). Action of the hyperpolarization-activated current (I_h) blocker ZD 7288 in hippocampal CA1 neurons. *Pflugers Arch.* 435, 99-106.

Gauss, R., Seifert, R. & Kaupp, U. B. (1998). Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393, 583-587.

Gebhardt, C., Breustedt, J. M., Noldner, M., Chatterjee, S. S. & Heinemann, U. (2001). The antiepileptic drug losigamone decreases the persistent Na⁺ current in rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 920, 27-31.

- Gillies, M. J., Traub, R. D., Lebeau, F. E., Davies, C. H., Gloveli, T., Buhl, E. H. & Whittington, M. A. (2002). A model of atropine-resistant theta oscillations in rat hippocampal area CA1. *J.Physiol.* 543, 779-793.
- Giocomo, L. M., Zilli, E. A., Fransen, E. & Hasselmo, M. E. (2007). Temporal frequency of subthreshold oscillations scales with entorhinal grid cell field spacing. *Science* 315, 1719-1722.
- Giocomo, L. M. & Hasselmo, M. E. (2008a). Computation by oscillations: Implications of experimental data for theoretical models of grid cells. *Hippocampus* 18, 1186-1199.
- Giocomo, L. M. & Hasselmo, M. E. (2008b). Time constants of h current in layer ii stellate cells differ along the dorsal to ventral axis of medial entorhinal cortex. *J.Neurosci.* 28, 9414-9425.
- Giocomo, L. M. & Hasselmo, M. E. (2009). Knock-out of HCN1 subunit flattens dorsal-ventral frequency gradient of medial entorhinal neurons in adult mice. *J.Neurosci.* 29, 7625-7630.
- Glasgow, S. D. & Chapman, C. A. (2008). Conductances mediating intrinsic theta-frequency membrane potential oscillations in layer II parasubicular neurons. *J.Neurophysiol.* 100, 2746-2756.
- Gloveli, T., Albrecht, D. & Heinemann, U. (1995). Properties of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 87, 145-152.
- Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R. M. & Heinemann, U. (1997). Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J.Neurophysiol.* 78, 3444-3449.
- Gloveli, T., Dugladze, T., Schmitz, D. & Heinemann, U. (2001). Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *Eur.J.Neurosci.* 13, 413-420.
- Gloveli, T., Dugladze, T., Rotstein, H. G., Traub, R. D., Monyer, H., Heinemann, U., Whittington, M. A. & Kopell, N. J. (2005a). Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102, 13295-13300.

- Gloveli, T., Dugladze, T., Saha, S., Monyer, H., Heinemann, U., Traub, R. D., Whittington, M. A. & Buhl, E. H. (2005b). Differential involvement of oriens/pyramidal interneurons in hippocampal network oscillations in vitro. *J.Physiol.* 562, 131-147.
- Gu, N., Vervaeke, K., Hu, H. & Storm, J. F. (2005). Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.* 566, 689-715.
- Gu, N., Vervaeke, K. & Storm, J. F. (2007). BK potassium channels facilitate high-frequency firing and cause early spike frequency adaptation in rat CA1 hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.* 580, 859-882.
- Gutfreund, Y., Yarom, Y. & Segev, I. (1995). Subthreshold oscillations and resonant frequency in guinea-pig cortical neurons: physiology and modelling. *J.Physiol.* 483, 621-640.
- Haas, J. S., Dorval, A. D. & White, J. A. (2007). Contributions of I_h to feature selectivity in layer II stellate cells of the entorhinal cortex. *J.Comput.Neurosci.* 22, 161-171.
- Hadley, J. K., Passmore, G. M., Tatulian, L., Al Qatari, M., Ye, F., Wickenden, A. D. & Brown, D. A. (2003). Stoichiometry of expressed KCNQ2/KCNQ3 potassium channels and subunit composition of native ganglionic M channels deduced from block by tetraethylammonium. *J.Neurosci.* 23, 5012-5019.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M. B. & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436, 801-806.
- Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I., & Freund, T. F. (2000). Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur.J.Neurosci.* 12, 3239-3249.
- Hajos, N., Palhalmi, J., Mann, E. O., Nemeth, B., Paulsen, O. & Freund, T. F. (2004). Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J.Neurosci.* 24, 9127-9137.

- Halliwell, J. V. & Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250, 71-92.
- Hardie, J. B. & Pearce, R. A. (2006). Active and passive membrane properties and intrinsic kinetics shape synaptic inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 26, 8559-8569.
- Heinemann, U., Albrecht, D., Beck, H., Ficker, E., von Haebler, D. & Stabel, J. (1992). Delayed K⁺ regulation and K⁺ current maturation as factors of enhanced epileptogenicity during ontogenesis of the hippocampus of rats. *Epilepsy Res.Suppl.* 9, 107-114.
- Hetka, R., Rundfeldt, C., Heinemann, U. & Schmitz, D. (1999). Retigabine strongly reduces repetitive firing in rat entorhinal cortex. *Eur.J.Pharmacol.* 386, 165-171.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J.Physiol.* 117, 500-544.
- Hu, H., Vervaeke, K. & Storm, J. F. (2002). Two forms of electrical resonance at theta frequencies, generated by M-current, h-current and persistent Na⁺ current in rat hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.* 545, 783-805.
- Hu, H., Vervaeke, K. & Storm, J. F. (2007). M-channels (Kv7/KCNQ channels) that regulate synaptic integration, excitability, and spike pattern of CA1 pyramidal cells are located in the perisomatic region. *J.Neurosci.* 27, 1853-1867.
- Hutcheon, B. & Yarom, Y. (2000). Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. *Trends Neurosci.* 23, 216-222.
- Inaba, Y., Biagini, G. & Avoli, M. (2006). The H current blocker ZD7288 decreases epileptiform hyperexcitability in the rat neocortex by depressing synaptic transmission. *Neuropharmacology* 51, 681-691.
- Ishizuka, N., Weber, J. & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J.Comp.Neurol.* 295, 580-623.

- Jentsch, T. J. (2000). Neuronal KCNQ potassium channels: physiology and role in disease. *Nat.Rev.Neurosci.* 1, 21-30.
- Kaupp, U. B. & Seifert, R. (2001). Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu.Rev.Physiol.* 63, 235-257.
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C. & Burwell, R. D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, 697-708.
- Klausberger, T. & Somogyi, P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 321, 53-57.
- Klink, R. & Alonso, A. (1993). Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J.Neurophysiol.* 70, 144-157.
- Klink, R. & Alonso, A. (1997a). Morphological characteristics of layer II projection neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Hippocampus* 7, 571-583.
- Klink, R. & Alonso, A. (1997b). Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J.Neurophysiol.* 77, 1813-1828.
- Koch, C. (1984). Cable theory in neurons with active, linearized membranes. *Biol.Cybern.* 50, 15-33.
- Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J. & Adelman, J. P. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709-1714.
- Lacaille, J. C. & Schwartzkroin, P. A. (1988). Stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. I. Intracellular response characteristics, synaptic responses, and morphology. *J.Neurosci.* 8, 1400-1410.
- Lampl, I. & Yarom, Y. (1997). Subthreshold oscillations and resonant behavior: two manifestations of the same mechanism. *Neuroscience* 78, 325-341.

Lawrence, J. J., Saraga, F., Churchill, J. F., Statland, J. M., Travis, K. E., Skinner, F. K. & McBain, C. J. (2006). Somatodendritic Kv7/KCNQ/M channels control interspike interval in hippocampal interneurons. *J.Neurosci.* 26, 12325-12338.

Lerche, H., Biervert, C., Alekov, A. K., Schleithoff, L., Lindner, M., Klinger, W., Bretschneider, F., Mitrovic, N., Jurkat-Rott, K., Bode, H., Lehmann-Horn, F. & Steinlein, O. K. (1999). A reduced K⁺ current due to a novel mutation in KCNQ2 causes neonatal convulsions. *Ann.Neurol.* 46, 305-312.

Leung, L. W. S., Dasilva, F. H. L. & Wadman, W. J. (1982). Spectral Characteristics of the Hippocampal Eeg in the Freely Moving Rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 54, 203-219.

Lisman, J. (2005). The theta/gamma discrete phase code occurring during the hippocampal phase precession may be a more general brain coding scheme. *Hippocampus* 15, 913-922.

Llinás, R. & Yarom, Y. (1986). Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study. *J.Physiol.* 376, 163-182.

Llinás, R. R. (1988). The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function. *Science* 242, 1654-1664.

Lorente de Nó, R. (1934). Lorente de Nó, Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J.Psychol.Neurol.* 46, 113-177.

Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F. & Biel, M. (1998). A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393, 587-591.

Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. & Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J.* 18, 2323-2329.

Lüthi, A. & McCormick, D. A. (1998). H-current: properties of a neuronal and network pacemaker. *Neuron* 21, 9-12.

- Maccaferri, G., Mangoni, M., Lazzari, A. & DiFrancesco, D. (1993). Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J.Neurophysiol.* 69, 2129-2136.
- Maccaferri, G. & McBain, C. J. (1996). The hyperpolarization-activated current (I_h) and its contribution to pacemaker activity in rat CA1 hippocampal stratum oriens-alveus interneurons. *J.Physiol.* 497, 119-130.
- Magee, J. C. (1998). Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 18, 7613-7624.
- Magee, J. C. (1999). Dendritic I_h normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat.Neurosci.* 2, 508-514.
- Manseau, F., Goutagny, R., Danik, M. & Williams, S. (2008). The hippocamptoseptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro. *J.Neurosci.* 28, 4096-4107.
- Marcelin, B., Chauviere, L., Becker, A., Migliore, M., Esclapez, M. & Bernard, C. (2009). h channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy. *Neurobiol.Dis.* 33, 436-447.
- Markram, H., Lubke, J., Frotscher, M. & Sakmann, B. (1997). Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275, 213-215.
- Maurer, A. P., Vanrhoads, S. R., Sutherland, G. R., Lipa, P. & McNaughton, B. L. (2005). Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septo-temporal axis of the hippocampus. *Hippocampus* 15, 841-852.
- McCloskey, K. D., Toland, H. M., Hollywood, M. A., Thornbury, K. D. & McHale, N. G. (1999). Hyperpolarisation-activated inward current in isolated sheep mesenteric lymphatic smooth muscle. *J.Physiol.* 521, 201-211.

- Meldrum, B. S. & Rogawski, M. A. (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 4, 18-61.
- Mellor, J., Nicoll, R. A. & Schmitz, D. (2002). Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels. *Science* 295, 143-147.
- Moody, W. J. & Bosma, M. M. (2005). Ion channel development, spontaneous activity, and activity-dependent development in nerve and muscle cells. *Physiol.Rev.* 85, 883-941.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F. & Ludwig, A. (1999). Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol.Chem.* 380, 975-980.
- Moser, M. B. & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608-619.
- Müller, W., Misgeld, U. & Heinemann, U. (1988). Carbachol effects on hippocampal neurons in vitro: dependence on the rate of rise of carbachol tissue concentration. *Exp.Brain Res.* 72, 287-298.
- Müller, F., Scholten, A., Ivanova, E., Haverkamp, S., Kremmer, E. & Kaupp, U. B. (2003). HCN channels are expressed differentially in retinal bipolar cells and concentrated at synaptic terminals. *Eur.J.Neurosci.* 17, 2084-2096.
- Narayanan, R. & Johnston, D. (2007). Long-term potentiation in rat hippocampal neurons is accompanied by spatially widespread changes in intrinsic oscillatory dynamics and excitability. *Neuron* 56, 1061-1075.
- Nolan, M. F., Malleret, G., Dudman, J. T., Buhl, D. L., Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., Buzsáki, G., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. & Morozov, A. (2004). A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell* 119, 719-732.
- Nolan, M. F., Dudman, J. T., Dodson, P. D. & Santoro, B. (2007). HCN1 channels control resting and active integrative properties of stellate cells from layer II of the entorhinal cortex. *J.Neurosci.* 27, 12440-12451.

- Notomi, T. & Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical localization of Ih channel subunits, HCN1-4, in the rat brain. *J.Comp.Neurol.* 471, 241-276.
- Numann, R. E., Wadman, W. J. & Wong, R. K. (1987). Outward currents of single hippocampal cells obtained from the adult guinea-pig. *J.Physiol.* 393, 331-353.
- O'Keefe, J. & Recce, M. L. (1993). Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 3, 317-330.
- O'Keefe, J. & Burgess, N. (1999). Theta activity, virtual navigation and the human hippocampus. *Trends Cogn. Sci.* 3, 403-406.
- O'Keefe, J. & Burgess, N. (2005). Dual phase and rate coding in hippocampal place cells: theoretical significance and relationship to entorhinal grid cells. *Hippocampus* 15, 853-866.
- Orban, G., Kiss, T. & Erdi, P. (2006). Intrinsic and synaptic mechanisms determining the timing of neuron population activity during hippocampal theta oscillation. *J.Neurophysiol.* 96, 2889-2904.
- Otto, J. F., Kimball, M. M. & Wilcox, K. S. (2002). Effects of the anticonvulsant retigabine on cultured cortical neurons: changes in electroresponsive properties and synaptic transmission. *Mol.Pharmacol.* 61, 921-927.
- Paxinos G. & Watson C. (2004). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Fourth Edition., New York. Elsevier. USA.
- Pedarzani, P. & Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small--and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cell Mol.Life Sci.* 65, 3196-3217.
- Peretz, A., Sheinin, A., Yue, C., Degani-Katzav, N., Gibor, G., Nachman, R., Gopin, A., Tam, E., Shabat, D., Yaari, Y. & Attali, B. (2007). Pre- and postsynaptic activation of M-channels by a novel opener dampens neuronal firing and transmitter release. *J.Neurophysiol.* 97, 283-295.

- Peters, H. C., Hu, H., Pongs, O., Storm, J. F. & Isbrandt, D. (2005). Conditional transgenic suppression of M channels in mouse brain reveals functions in neuronal excitability, resonance and behavior. *Nat.Neurosci.* 8, 51-60.
- Pietersen, A. N., Lancaster, D. M., Patel, N., Hamilton, J. B. & Vreugdenhil, M. (2009). Modulation of gamma oscillations by endogenous adenosine through A1 and A2A receptors in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 56, 481-492.
- Pike, F. G., Goddard, R. S., Suckling, J. M., Ganter, P., Kasthuri, N. & Paulsen, O. (2000). Distinct frequency preferences of different types of rat hippocampal neurones in response to oscillatory input currents. *J.Physiol.* 529, 205-213.
- Puil, E., Gimbarzevsky, B. & Miura, R. M. (1986). Quantification of membrane properties of trigeminal root ganglion neurons in guinea pigs. *J.Neurophysiol.* 55, 995-1016.
- Puil, E., Meiri, H. & Yarom, Y. (1994). Resonant behavior and frequency preferences of thalamic neurons. *J.Neurophysiol.* 71, 575-582.
- Rasmussen, H. B., Frokjaer-Jensen, C., Jensen, C. S., Jensen, H. S., Jorgensen, N. K., Misonou, H., Trimmer, J. S., Olesen, S. P. & Schmitt, N. (2007). Requirement of subunit co-assembly and ankyrin-G for M-channel localization at the axon initial segment. *J.Cell Sci.* 120, 953-963.
- Revonsuo, A. & Newman, J. (1999). Binding and consciousness. *Conscious.Cogn.* 8, 123-127.
- Ribak, C. E., Seress, L. & Amaral, D. G. (1985). The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J.Neurocytol.* 14, 835-857.
- Richter, H., Klee, R., Heinemann, U. & Eder, C. (1997). Developmental changes of inward rectifier currents in neurons of the rat entorhinal cortex. *Neurosci.Lett.* 228, 139-141.
- Richter, H., Heinemann, U. & Eder, C. (2000). Hyperpolarization-activated cation currents in stellate and pyramidal neurons of rat entorhinal cortex. *Neurosci.Lett.* 281, 33-36.
- Robinson, R. B. & Siegelbaum, S. A. (2003). Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu.Rev.Physiol.* 65, 453-480.

Rotstein, H. G., Pervouchine, D. D., Acker, C. D., Gillies, M. J., White, J. A., Buhl, E. H., Whittington, M. A. & Kopell, N. (2005). Slow and fast inhibition and an H-current interact to create a theta rhythm in a model of CA1 interneuron network. *J.Neurophysiol.* 94, 1509-1518.

Rundfeldt, C. (1997). The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells. *Eur.J.Pharmacol.* 336, 243-249.

Rundfeldt, C. & Netzer, R. (2000). The novel anticonvulsant retigabine activates M-currents in Chinese hamster ovary-cells transfected with human KCNQ2/3 subunits. *Neurosci.Lett.* 282, 73-76.

Sah, P., Hestrin, S. & Nicoll, R. A. (1989). Tonic activation of NMDA receptors by ambient glutamate enhances excitability of neurons. *Science* 246, 815-818.

Santoro, B. & Tibbs, G. R. (1999). The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 868, 741-764.

Santoro, B., Chen, S., Lüthi, A., Pavlidis, P., Shumyatsky, G. P., Tibbs, G. R. & Siegelbaum, S. A. (2000). Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J.Neurosci.* 20, 5264-5275.

Saraga, F., Wu, C. P., Zhang, L. & Skinner, F. K. (2003). Active dendrites and spike propagation in multi-compartment models of oriens-lacunosum/molecularare hippocampal interneurons. *J.Physiol.* 552, 673-689.

Sargolini, F., Fyhn, M., Hafting, T., McNaughton, B. L., Witter, M. P., Moser, M. B. & Moser, E. I. (2006). Conjunctive representation of position, direction, and velocity in entorhinal cortex. *Science* 312, 758-762.

Satoh, T. O. & Yamada, M. (2002). Multiple inhibitory effects of zatebradine (UL-FS 49) on the electrophysiological properties of retinal rod photoreceptors. *Pflugers Arch.* 443, 532-540.

Savic, N., Pedarzani, P. & Sciancalepore, M. (2001). Medium afterhyperpolarization and firing pattern modulation in interneurons of stratum radiatum in the CA3 hippocampal region. *J.Neurophysiol.* 85, 1986-1997.

Schmitz, D., Gloveli, T. & Heinemann, U. (1995). Effects of losigamone on synaptic potentials and spike frequency habituation in rat entorhinal cortex and hippocampal CA1 neurones. *Neurosci.Lett.* 200, 141-143.

Schmitz, D., Gloveli, T., Behr, J., Dugladze, T. & Heinemann, U. (1998). Subthreshold membrane potential oscillations in neurons of deep layers of the entorhinal cortex. *Neuroscience* 85, 999-1004.

Schreiber, S., Erchova, I., Heinemann, U. & Herz, A. V. (2004). Subthreshold resonance explains the frequency-dependent integration of periodic as well as random stimuli in the entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* 92, 408-415.

Schreiber, S., Samengo, I. & Herz, A. V. (2009). Two Distinct Mechanisms Shape the Reliability of Neural Responses. *J.Neurophysiol.* 101, 2239-2251.

Schroeder, B. C., Kubisch, C., Stein, V. & Jentsch, T. J. (1998). Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396, 687-690.

Schroeder, B. C., Hechenberger, M., Weinreich, F., Kubisch, C. & Jentsch, T. J. (2000). KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J.Biol.Chem.* 275, 24089-24095.

Schwarz, J. R., Glassmeier, G., Cooper, E. C., Kao, T. C., Nodera, H., Tabuena, D., Kaji, R. & Bostock, H. (2006). KCNQ channels mediate IKs, a slow K⁺ current regulating excitability in the rat node of Ranvier. *J.Physiol.* 573, 17-34.

Seress, L. & Ribak, C. E. (1983). GABAergic cells in the dentate gyrus appear to be local circuit and projection neurons. *Exp.Brain Res.* 50, 173-182.

Shah, M. M., Mistry, M., Marsh, S. J., Brown, D. A. & Delmas, P. (2002). Molecular correlates of the M-current in cultured rat hippocampal neurons. *J.Physiol.* 544, 29-37.

Shah, M. M., Migliore, M., Valencia, I., Cooper, E. C. & Brown, D. A. (2008). Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105, 7869-7874.

Singh, N. A., Charlier, C., Stauffer, D., DuPont, B. R., Leach, R. J., Melis, R., Ronen, G. M., Bjerre, I., Quattlebaum, T., Murphy, J. V., McHarg, M. L., Gagnon, D., Rosales, T. O., Peiffer, A., Anderson, V. E. & Leppert, M. (1998). A novel potassium channel gene, KCNQ2, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat.Genet.* 18, 25-29.

Sokolova, S., Schmitz, D., Zhang, C. L., Loscher, W. & Heinemann, U. (1998). Comparison of effects of valproate and trans-2-en-valproate on different forms of epileptiform activity in rat hippocampal and temporal cortex slices. *Epilepsia* 39, 251-258.

Somogyi, P. & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J.Physiol.* 562, 9-26.

Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat.Rev.Neurosci.* 9, 206-221.

Stackman, R. W., Hammond, R. S., Linardatos, E., Gerlach, A., Maylie, J., Adelman, J. P. & Tzounopoulos, T. (2002). Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J.Neurosci.* 22, 10163-10171.

Steffenach, H. A., Witter, M., Moser, M. B. & Moser, E. I. (2005). Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45, 301-313.

Stenkamp, K., Palva, J. M., Uusisaari, M., Schuchmann, S., Schmitz, D., Heinemann, U. & Kaila, K. (2001). Enhanced temporal stability of cholinergic hippocampal gamma oscillations following respiratory alkalosis in vitro. *J.Neurophysiol.* 85, 2063-2069.

Stocker, M., Krause, M. & Pedarzani, P. (1999). An apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 4662-4667.

Stocker, M. (2004). Ca^{2+} -activated K^{+} channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat.Rev.Neurosci.* 5, 758-770.

Storm, J. F. (1988). Temporal integration by a slowly inactivating K^{+} current in hippocampal neurons. *Nature* 336, 379-381.

- Storm, J. F. (1989). An after-hyperpolarization of medium duration in rat hippocampal pyramidal cells. *J.Physiol.* 409, 171-190.
- Storm, J. F. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog.Brain Res.* 83, 161-187.
- Strauss, U., Kole, M. H., Brauer, A. U., Pahnke, J., Bajorat, R., Rolfs, A., Nitsch, R. & Deisz, R. A. (2004). An impaired neocortical Ih is associated with enhanced excitability and absence epilepsy. *Eur.J.Neurosci.* 19, 3048-3058.
- Su, H., Alroy, G., Kirson, E. D. & Yaari, Y. (2001). Extracellular calcium modulates persistent sodium current-dependent burst-firing in hippocampal pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 21, 4173-4182.
- Suh, B. C., Horowitz, L. F., Hirdes, W., MacKie, K. & Hille, B. (2004). Regulation of KCNQ2/KCNQ3 current by G protein cycling: the kinetics of receptor-mediated signaling by Gq. *J.Gen.Physiol.* 123, 663-683.
- Surges, R., Brewster, A. L., Bender, R. A., Beck, H., Feuerstein, T. J. & Baram, T. Z. (2006). Regulated expression of HCN channels and cAMP levels shape the properties of the h current in developing rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* 24, 94-104.
- Tamamaki, N. & Nojyo, Y. (1995). Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. *J.Comp.Neurol.* 353, 379-390.
- Tatulian, L., Delmas, P., Abogadie, F. C. & Brown, D. A. (2001). Activation of expressed KCNQ potassium currents and native neuronal M-type potassium currents by the anti-convulsant drug retigabine. *J.Neurosci.* 21, 5535-5545.
- Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P. & Ramirez, J. M. (2000). The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *J.Neurosci.* 20, 2994-3005.
- Tokimasa, T. & Akasu, T. (1990). Cyclic AMP regulates an inward rectifying sodium-potassium current in dissociated bull-frog sympathetic neurones. *J.Physiol.* 420, 409-429.

- Traub, R. D., Kopell, N., Bibbig, A., Buhl, E. H., Lebeau, F. E. & Whittington, M. A. (2001). Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J.Neurosci.* 21, 9478-9486.
- Traub, R. D., Pais, I., Bibbig, A., Lebeau, F. E., Buhl, E. H., Hormuzdi, S. G., Monyer, H. & Whittington, M. A. (2003). Contrasting roles of axonal (pyramidal cell) and dendritic (interneuron) electrical coupling in the generation of neuronal network oscillations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100, 1370-1374.
- Traub, R. D., Bibbig, A., Lebeau, F. E., Buhl, E. H. & Whittington, M. A. (2004). Cellular mechanisms of neuronal population oscillations in the hippocampus in vitro. *Annu.Rev.Neurosci.* 27, 247-278.
- Tukker, J. J., Fuentealba, P., Hartwich, K., Somogyi, P. & Klausberger, T. (2007). Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J.Neurosci.* 27, 8184-8189.
- Tzingounis, A. V. & Nicoll, R. A. (2008). Contribution of KCNQ2 and KCNQ3 to the medium and slow afterhyperpolarization currents. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105, 19974-19979.
- Ulrich, D. (2002). Dendritic resonance in rat neocortical pyramidal cells. *J.Neurophysiol.* 87, 2753-2759.
- van Haeften, T., Wouterlood, F. G., Jorritsma-Byham, B. & Witter, M. P. (1997). GABAergic presubicular projections to the medial entorhinal cortex of the rat. *J.Neurosci.* 17, 862-874.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 26, 407-418.
- Velumian, A. A. & Carlen, P. L. (1999). Differential control of three after-hyperpolarizations in rat hippocampal neurones by intracellular calcium buffering. *J.Physiol.* 517, 201-216.
- Vervaeke, K., Hu, H., Graham, L. J. & Storm, J. F. (2006). Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49, 257-270.

- Wang, W. T., Wan, Y. H., Zhu, J. L., Lei, G. S., Wang, Y. Y., Zhang, P. & Hu, S. J. (2006). Theta-frequency membrane resonance and its ionic mechanisms in rat subicular pyramidal neurons. *Neuroscience* 140, 45-55.
- Wang, X. J. & Buzsáki, G. (1996). Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J.Neurosci.* 16, 6402-6413.
- Weber, Y. G., Geiger, J., Kampchen, K., Landwehrmeyer, B., Sommer, C. & Lerche, H. (2006). Immunohistochemical analysis of KCNQ2 potassium channels in adult and developing mouse brain. *Brain Res.* 1077, 1-6.
- Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. & Salkoff, L. (1990). K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and mouse. *Science* 248, 599-603.
- Weiss, T., Veh, R. W. & Heinemann, U. (2003). Dopamine depresses cholinergic oscillatory network activity in rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* 18, 2573-2580.
- Welinder, P. E., Burak, Y. & Fiete, I. R. (2008). Grid cells: the position code, neural network models of activity, and the problem of learning. *Hippocampus* 18, 1283-1300.
- White, J. A., Klink, R., Alonso, A. & Kay, A. R. (1998). Noise from voltage-gated ion channels may influence neuronal dynamics in the entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* 80, 262-269.
- Whittington, M. A., Traub, R. D. & Jefferys, J. G. (1995). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373, 612-615.
- Whittington, M. A., Traub, R. D., Faulkner, H. J., Jefferys, J. G. & Chettiar, K. (1998). Morphine disrupts long-range synchrony of gamma oscillations in hippocampal slices. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 5807-5811.
- Williamson, A. & Alger, B. E. (1990). Characterization of an early afterhyperpolarization after a brief train of action potentials in rat hippocampal neurons in vitro. *J.Neurophysiol.* 63, 72-81.

Witter, M. P., Van Hoesen, G. W. & Amaral, D. G. (1989). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J.Neurosci.* 9, 216-228.

Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus* 3, 33-44.

Witter, M. P., Naber, P. A., van Haeften, T., Machielsen, W. C., Rombouts, S. A., Barkhof, F., Scheltens, P. & Lopes da Silva, F. H. (2000). Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10, 398-410.

Witter, M. P. & Amaral, D. G. (2004). Hippocampal Formation. In *The Rat Nervous System*, Third Edition, ed. Paxinos, G., New York. Elsevier. USA., pp. 635-704.

Wojtowicz, A. M., van den Boom, L., Chakrabarty, A., Maggio, N., Haq, R. U., Behrens, C. J. & Heinemann, U. (2009). Monoamines block kainate- and carbachol-induced gamma-oscillations but augment stimulus-induced gamma-oscillations in rat hippocampus in vitro. *Hippocampus* 19, 273-88.

Wollmuth, L. P. & Hille, B. (1992). Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J.Gen.Physiol.* 100, 749-765.

Wulff, P., Ponomarenko, A. A., Bartos, M., Korotkova, T. M., Fuchs, E. C., Bahner, F., Both, M., Tort, A. B., Kopell, N. J., Wisden, W. & Monyer, H. (2009). Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 106, 3561-3566.

Wyss, J. M. (1981). An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J.Comp.Neurol.* 199, 495-512.

Yoshida, M. & Alonso, A. (2007). Cell-type specific modulation of intrinsic firing properties and subthreshold membrane oscillations by the M(Kv7)-current in neurons of the entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* 98, 2779-2794.

Yue, C. & Yaari, Y. (2004). KCNQ/M channels control spike afterdepolarization and burst generation in hippocampal neurons. *J.Neurosci.* 24, 4614-4624.

Yue, C., Remy, S., Su, H., Beck, H. & Yaari, Y. (2005). Proximal persistent Na⁺ channels drive spike afterdepolarizations and associated bursting in adult CA1 pyramidal cells. *J.Neurosci.* 25, 9704-9720.

Yue, C. & Yaari, Y. (2006). Axo-somatic and apical dendritic Kv7/M channels differentially regulate the intrinsic excitability of adult rat CA1 pyramidal cells. *J.Neurophysiol.* 95, 3480-3495.

Zhang, C. L., Chatterjee, S. S., Stein, U. & Heinemann, U. (1992). Comparison of the effects of losigamone and its isomers on maximal electroshock induced convulsions in mice and on three different patterns of low magnesium induced epileptiform activity in slices of the rat temporal cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 345, 85-92.

B. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die zum Gelingen der vorliegenden Promotionsarbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Brecht für die Betreuung und Durchsicht dieser Arbeit sowie für die Überlassung des Themas.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann für seine kontinuierliche Betreuung, die konstruktive Kritik und die hilfreichen Anleitungen.

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schmitz danke ich für Durchsicht dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Lutz Schimansky-Geier und Herrn Prof. Dr. Andreas Herz für ihre Hilfe hinsichtlich der theoretisch-physikalischen Hintergründe besonders am Anfang meiner Arbeit danken.

Großer Dank gilt meinen Kooperationspartnerinnen Frau Dr. Irina Erchova, die mir bei den Analysen mit der Software MATLAB den Einstieg ermöglicht hat, und Frau Dr. Christine Gebhardt für die vielen Anregungen sowie für die kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, das größte „*Danke Schön*“ an Dr. Christian Henneberger zu richten.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für ihre fortwährende Unterstützung.

C. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Entsprechend der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin erkläre ich, Anne Boehlen, geboren am 5. August 1978 in Duisburg, an Eides statt, die vorliegende Dissertationsarbeit mit dem Titel: „Resonanzverhalten und Netzwerkoszillationen in der hippokampalen Formation der Ratte *in vitro*.“ selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter unter ausschließlicher Nutzung der aufgeführten Materialien, Methoden und Literaturquellen angefertigt zu haben. Ebenfalls versichere ich, an Eides statt, dass ich mich an keinem anderen Ort um einen Doktorgrad beworben habe oder bereits einen solchen besitze und mir die genannte Promotionsordnung bekannt ist.

Berlin, den 23. September 2009

Anne Boehlen